

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**IgA polimérica del suero humano normal : identificación,  
propiedades inmunológicas y significación fisiopatológica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Emilio Cuadrado del Barrio**

DIRECTOR:

**Manuel Serrano Rios**

**Madrid, 2015**

Emilio Cuadrado del Barrio

TP  
1981  
168



X-53-117627-3

IgA POLIMERICA DEL SUERO HUMANO NORMAL. IDENTIFICACION,  
PROPIEDADES INMUNOLOGICAS Y SIGNIFICACION FISIOPATOLOGICA

Departamento de Patología General  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid  
1981



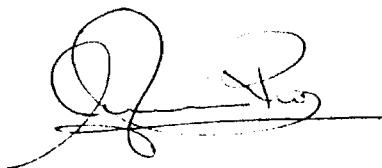
BIBLIOTECA

© Emilio Cuadrado del Barrio  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1981  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-31073-1981

Dr. D. Manuel Serrano Rios, Profesor Agregado de Patología General, encargado de la Cátedra nº 2 de Patología General de la Facultad de - Medicina de la Universidad Complutense de Madrid certifica:

Como director de la tesis titulada - IgA polimérica del suero humano normal, identifica---ción, propiedades inmunológicas y significa--ción fisiopatológica -, que para optar al grado de Doctor presenta D. Emilio Cuadrado del Barrio, Licenciado en Medicina y Cirugía, que reúne todos los requisitos científicos necesarios para su presentación ante el tribunal -- que se designe al efecto para su enjuiciamiento.

Lo que hago constar en Madrid, a diecinueve - de febrero de mil novecientos ochenta.





DEDICATORIA

A mi mujer

A mis padres



#### AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento al Prof. Manuel Serrano Ríos, en una doble vertiente. Por un lado como director de mi Tesis por su apoyo constante y su valioso criticismo. Por otro lado y desde un punto de vista humano, por haber sido una de las personas que han influido mas positivamente en mi formación.

Al Prof Jean Pierre Vaerman, de la Universidad Católica de Lovaina, con quien tuve la fortuna de trabajar por un breve periodo, en el cual realicé la primera parte de este trabajo, por sus inestimables enseñanzas y la cordial acogida que me dispensó.

A mis colaboradores y amigos Drs Mercedes Garcia Gonzalez, Pilar Echaniz y Miguel Ochoa de Olza que con su trabajo entusiasta y útiles discusiones han hecho posible la realización de este trabajo.

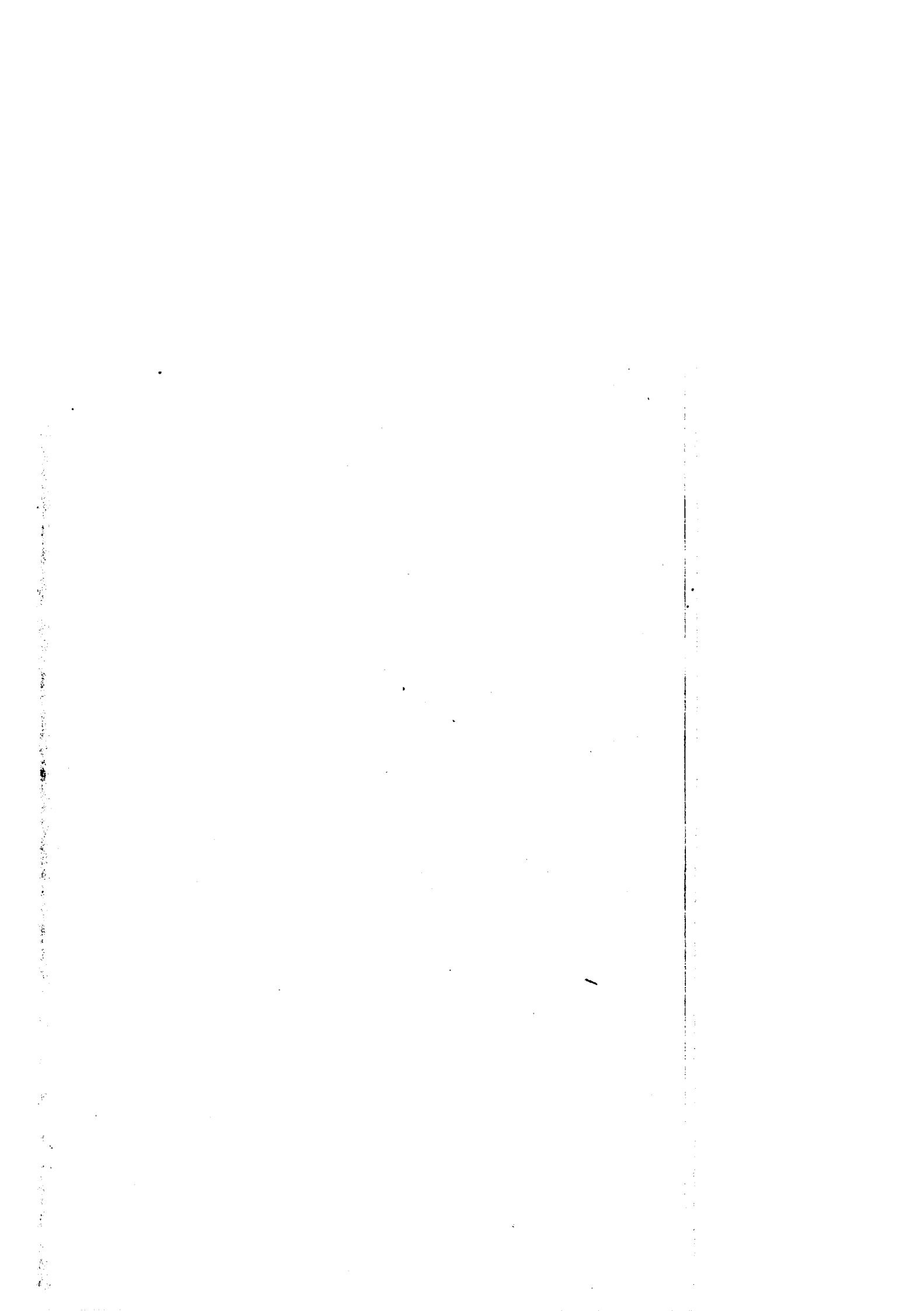
Al Dr J.I. Arenas, jefe del Servicio de Digestivo de la R. S, Virgen de Aránzazu, por proporcionarme gran parte del material incluido en este trabajo, y la ayuda que me ha prestado a través de su crítica y sugerencias siempre de gran valor.

Al Dr A Damiano, jefe del Depto de Medicina Interna por las facilidades y ayuda que ha prestado en todo momento a mi trabajo.

Y de manera muy especial, a mi mujer, por su abnegación, su estímulo constante y su propio trabajo al mecanografiar el manuscrito.

---





IgA POLIMERICA DEL SUERO HUMANO NORMAL  
Identificación, propiedades inmunológicas y  
significación fisiopatológica.

Abreviaturas empleadas

S H N	=	Suero humano normal.
IgA mon	=	IgA monomérica.
IgA pol	=	IgA polimérica.
IgA S	=	IgA secretoria.
C S	=	Componente secretor.
Alfa A-T	=	Alfa 1 anti tripsina.
E F	=	Electroforesis.
I E F	=	Inmunoelectroforesis.
I F	=	Inmunofluorescencia.
P B S	=	Solución salina tamponada con fosfatos.
2 M E	=	2 mercaptoetanol.
D T T	=	Ditioeritritol.
I A	=	Yodacetamida.
S D S	=	Dodecil sulfato sódico

-----

I N D I C E

INTRODUCCION.....	Pag. 4
OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO ...	Pag. 16
MATERIAL Y METODOS .....	Pag. 19
RESULTADOS .....	Pag. 35
DISCUSION .....	Pag. 72
CONCLUSIONES .....	Pag.113
RESUMEN Y PERSPECTIVAS .....	Pag.118
BIBLIOGRAFIA .....	Pag.122

-----

Pag. 4

I N T R O D U C C I O N

El concepto de que la inmunidad local se establece independientemente de la inmunidad sistémica - fué propuesto hace muchos años (BESREDKA 1919, BULL - 1929). Sin embargo los primeros experimentos acerca de la naturaleza de las inmunoglobulinas presentes - en las secreciones externas (aquellas que bañan a -- las mucosas que están en continuidad con el exterior del organismo) proceden de GUGLER (1958) que llamó - la atención acerca del predominio de la IgA en el ca - lostro. Varios estudios posteriores confirmaron el - caracter preponderante de esta clase de inmunoglobulina en diferentes secreciones externas (CHORDIKER - 1963) y fundamentaron el concepto de que en las se - creciones externas existe un sistema inmunológico hu - mbral local diferente de las inmunoglobulinas del -- suero, cuyo principal agente, cuantitativa y cualita - tivamente es una particular variante de la IgA deno - minada IgA secretoria (TOMASI 1968).

La función del sistema de inmunidad local pa - rece estar principalmente relacionado con propiedades antibacterianas y antivirales de la IgA secretoria - (IgA.S.); hay numerosas pruebas del importante papel que juega esta especie de Ig en la defensa contra en - fermedades virales: v.gr. gripe (WALDMAN 1968-1969), poliomielitis (OGRA 1969). Y aunque no tan evidentes como en las anteriores también hay pruebas a favor - de su papel defensivo en infecciones bacterianas como el cólera (FUBARA 1973).

Otra posible función de la IgA S es impedir la absorción de materiales en forma potencialmente antigénica a través del intestino por ej. antígenos alimenticios. Las personas que carecen de IgA S secretoria a menudo presentan niveles elevados de anticuerpos séricos frente a ciertos antígenos de los alimentos, como proteínas de la leche (BUCKLEY 1969, HEREMANS 1971). Es posible también que el papel funcional de la IgA S dependa en gran medida de su aparente incapacidad para provocar reacciones de hipersensibilidad; estos anticuerpos al combinarse con los antígenos bloquearían su reacción con inmunoglobulinas de otras -- clases capaces de provocar reacciones de tipo anafiláctico, citotóxico ect, potencialmente perjudiciales para el organismo. Parece pues como si la IgA S representara un tipo particular de "anticuerpo inofensivo" capaz de extraer los antígenos que alcanzan las superficies mucosas y de ejercer una acción letal sobre -- los virus (HOBBS 1977). A pesar de que en sujetos que carecen de IgA se ha descrito una mayor incidencia de enfermedades autoinmunes, infecciones recurrentes, y trastornos gastrointestinales (CRABBE 1967, SOUTH -- 1968), muchas personas con deficiencia de IgA no muestran ningún signo de enfermedad (GOLDBERG 1968). La -- razón parece ser que en ellas la falta de IgA S se -- compensa por la presencia de elevadas concentraciones de otras inmunoglobulinas particularmente IgM.

La IgA S se compone de un dímero de IgA que contiene cadena J y una molécula asociada el componente secretor S.C. que es sintetizada por las células de los epitelios mucosos.

Las moléculas del dímero están constituidas por subunidades de las subclases IgA<sub>1</sub> ó IgA<sub>2</sub> con cadenas ligeras K o L lo que es un fuerte argumento a favor de que ambas subunidades son el producto de una misma célula. No hay ningún argumento a favor de que la porción Ig sea diferente de la IgA del suero ya que no se ha encontrado ningún determinante antigénico o peculiaridad estructural que sean propios de la porción Ig de la IgA S. Su característica fundamental es la de estar unida al C.S. propiedad que se basa en su afinidad de combinación con esta molécula, lo cual es una característica común a todas las inmunoglobulinas poliméricas. Otra propiedad común a todas estas proteínas es la de tener un mayor o menor contenido en cadena J. Esta molécula es sintetizada por inmunocitos de las diferentes clases (BRANDTZAEG, 1976) y se ha especulado sobre su posible intervención en el mecanismo de la polimerización (DE LA CORTE, 1973). Su unión a los polímeros se realiza a través de puentes disulfuro y enlaces no covalentes; la unión covalente se establece a nivel del penúltimo residuo de cisteína del octapéptido C terminal de las cadenas alfa y mu (MESTEDKY, 1974). A nivel de estos últimos residuos en las cadenas alfa y



mu hay una considerable homología que ha podido comprobarse en especies muy alejadas de la escala filogenética. La cadena J ha sido demostrada como parte integrante de las Igs poliméricas en una gran variedad de especies, y sus caracteres antigénicos son muy similares al comparar preparaciones purificadas obtenidas de diferentes especies animales (KOBAYASHI 1973).

Aunque hay discrepancias respecto al contenido en cadena J de los polímeros de diferentes clases, la mayoría de los autores están de acuerdo en que hay una sola cadena J y una molécula de C.S. -- por cada molécula de IgA S (HURLIMAN 1968, MESTEDKY 1972, HALPERN 1973). El tamaño de la molécula total es de alrededor de 400.000 daltons (TOMASI, 1968, - KOBAYASHI 1971). A cada subunidad IgA corresponde un peso molecular de 160.000 (DORRINGTON 1970), al C.S. 70.000 a 75.000 (KOBAYASHI 1971, LAMM 1972), y a la cadena J, 19.000 (WILDE 1973). Los coeficientes de sedimentación publicados en la literatura son : 10,5 a 11,7S para la IgA S (AXELSON 1966, TOMASI, - 1968, KOBAYASHI 1971; ) 6,2 a 6,9S para la IgA mon. - (TOMASI 1968); 9,1 a 9,6S para la IgA dimérica (DORRINGTON, 1970); 4,5 a 5 S para el C.S. (KOBAYASHI - 1971).

El análisis de la estructura primaria del C.S. ha revelado como datos más destacables la ausen

cia de metionina (MESTEDKY 1974) y un contenido en carbohidratos de alrededor del 20% (LINDH, 1974).

La forma de la IgA S ha sido estudiada recientemente por LINDH (1975) por procedimientos hidrodinámicos. Sus resultados sugieren firmemente que las diferencias de forma entre las IgA S y los dímeros de IgA observados por electromicroscopía (SVEHAG 1970, DOURMASHKIN 1971) son probablemente erróneos surgiendo como más probable en ambos casos el modelo de doble Y extendida con los fragmentos Fab de las subunidades en situación opuesta. El mismo autor, ha analizado comparativamente la configuración interna de las moléculas IgA S, IgA dim, e IgA mon, por dispersión rotatoria óptica y dicroísmo circular. Los espectros de los tres tipos de moléculas fueron muy similares lo que indica que ni la presencia de cadena J ni la unión al CS alteran significativamente la configuración interna de la IgA.

Una conclusión importante derivada de los estudios arriba citados es que no existe diferencia antigénica, estructural o funcional entre la IgA secretoria y los complejos formados por la unión de IgA dimérica del suero con el CS. Este dato plantea interesantes especulaciones acerca del significado de la IgA polimérica del suero.

(1) ¿Hasta que punto el sistema inmunosecretor es independiente del "pool" de IgA sérica?

(2) ¿Existen relaciones entre la IgA S y la IgA - polimérica del suero?.

(3) ¿Hay algún mecanismo fisiológico encargado de regular la hipotética participación de la IgA polimérica en el sistema de inmunidad local?.

(4) ¿Existe alguna patología que esté relacionada con variaciones de la concentración de IgA polimérica en la circulación?.

Todas estas interrogantes han constituido objetivos fundamentales de nuestro trabajo.

-----

Origen celular de la IgA S y de la IgA polimérica del suero:

Los primeros estudios de inmunofluorescencia en el tubo digestivo (CRABBE, 1965) demostraron la gran acumulación de inmunocitos en la lámina propia del tubo digestivo particularmente de la clase IgA y reforzaron la hipótesis de que las Igs presentes en las secreciones externas tienen un origen local y no sistémico. Los mismos autores realizaron estudios cuantitativos de la distribución de células productoras de Igs de las diferentes clases a todo lo largo del tubo digestivo (CRABBE, 1968). - Sus resultados mostraron densidades de 350.000, 51.000 y 15.000 inmunocitos productores de IgA, IgM, e IgG respectivamente.

tivamente por mm. cúbico. Estas células son elementos terminales derivados de células B precursoras localizadas principalmente en las placas de Peyer (CRAIG, 1971). Estos autores transfundieron suspensiones celulares - de placas de Peyer o ganglios poplíteos identificables por la presencia de un marcador alotípico a receptores irradiados y al cabo de seis días sacrificaron a los animales y examinaron la presencia de plasmocitos en la mucosa intestinal. Los receptores de células de placas de Peyer tenían un gran número de células productoras de IgA con el alotipo del donante. Por el contrario los receptores de células de ganglios periféricos, tenían muy escasas células en la lámina propia y no se detectaba el marcador alotípico.

La vía de migración de las células precursoras de las placas de Peyer a la lámina propia ha sido investigada por GOWANS (1964), FERGUSON (1976), y otros grupos de investigadores que han demostrado que es -- una ruta larga y compleja. Parece ser que las células salen de las placas de Peyer por los linfáticos eferentes y pasan por los ganglios mesentéricos al conducto mesentérico superior y al conducto torácico, para alcanzar la vena subclavia izquierda y llegar a la lámina propia a través de la circulación. Un pequeño porcentaje de células puede alcanzar directamente la mucosa por contigüidad sin utilizar esta vía lo que -- explica la mayor acumulación de células IgA en las --

vellosidades próximas a las placas de Peyer observada por CRABBE (1970). Una cuestión todavía no definitivamente resuelta es: ¿Por qué mecanismo éstas células - van a ir a residir selectivamente a los epitelios mucosos?. HALL (1970, 1974) ha demostrado que la diferenciación de inmunoblastos marcados con  $TH^3$  procedentes del conducto torácico a células plasmáticas productoras de IgA ocurre en la lámina propia y a diferencia de las células T que circulan por el conducto torácico, no son linfocitos recirculantes y tienen una vida corta. La diferenciación y migración de células precursoras de IgA está muy alterada en circunstancias - en las que hay ausencia o reducción drástica de linfocitos T. Obviamente el estímulo que podría llevar a la residencia y diferenciación final de las células - IgA podría ser el antígeno. Sin embargo numerosos experimentos han demostrado que no es así (MOORE, 1972, GUYGRANDE 1974). Se ha especulado sobre el posible papel del CS como determinante de la localización de células productoras de Igs poliméricas actuando como un receptor epitelial (WILLIAMS, 1975, BRANDTZAEG 1974). Esta función del CS ha sido investigada recientemente por BROWN (1977). Incubando secciones de intestino -- con paraproteínas IgA poliméricas marcadas con peroxidasa demostró que la IgA se fijaba a las células epiteliales con una distribución similar al CS. La unión de la IgA a las células no era inhibida por tratamientos previos de las secciones con sueros anti Igs ni - con proteínas monoméricas IgA o IgG, pero sí con proteínas poliméricas IgA o IgM. Estos experimentos han

confirmado resultados previos que demostraban la unión selectiva de los polímeros al CS presente en las células epiteliales; pero no hay ninguna prueba a favor de que este mecanismo esté implicado en la localización y diferenciación de las células precursoras. En una revisión sobre el tema PARROT (1976) sugiere la siguiente hipótesis: Las células B circulantes penetran en las mucosas a través de la red capilar de un modo absolutamente al azar; aquí bajo la influencia de antígenos intraluminales las correspondientes células B son inhibidas de retornar a la sangre seguramente como consecuencia de su diferenciación a células efectoras en la propia mucosa en un proceso dirigido por el antígeno que implica su proliferación y diferenciación terminal. Esta hipótesis vuelve a subrayar la importancia del antígeno en la vía de migración y diferenciación de los plasmocitos indicando que si bien es cierto que el antígeno no atrae a los inmunocitos a la lámina propia del tubo digestivo ejerce un control sobre las células que llegan allí a través de la circulación y condiciona su proliferación lo cual explica la escasez de células efectoras en animales criados en ambiente libre de gérmenes (FERGUSON, 1972); y porqué la inmunización local estimula preferentemente la síntesis local de anticuerpos (OGRA, 1969).

El origen de la IgA polimérica del suero no está definitivamente aclarado. En la médula ósea se ha encontrado un elevado porcentaje de células productoras de IgA con determinantes propios de la IgA polimérica (RADL, 1975), su presencia en los órganos linfáticos periféricos (bazo y ganglios linfáticos) no ha sido demostrada de manera unívoca y parece probable que

una gran parte tenga su origen en los linfáticos intestinales al igual que la IgA S. HEREMANS, (1969) y CRABBE (1969) demostraron que una parte del "pool" de IgA sérica es sintetizada por células del sistema inmuno--secretor. Estos autores mostraron que tras la inges---tión oral de antígenos, la respuesta de anticuerpos -- puede ser de dos tipos: (a) parenteral caracterizada - por la aparición consecutiva de anticuerpos IgM e IgG en el suero como resultado de la absorción de pequeñas cantidades del antígeno intacto que estimulan la sinte--sis de anticuerpos en los tejidos linfáticos periféri--cos y (b) entérica; los antígenos estimularían a los - tejidos linfáticos del tubo digestivo (lámina propia) y los anticuerpos difundirían en dos direcciones: ha--cia la luz como coproanticuerpos o a la circulación.

Existen además pruebas de que ciertos antígenos administrados por vía parenteral pueden alcanzar los - linfáticos del tubo digestivo y estimular la síntesis local de anticuerpos IgA (siendo una fuente de IgA S - y de IgA sérica).

Sin embargo, la posibilidad de que esta IgA sé--rica de procedencia intestinal sea verdaderamente IgA polimérica no ha sido hasta el presente suficientemen--te investigada, aunque parece razonable a la luz de algunos datos experimentales. Si se admite que la afinidad por el CS es un marcador selectivo de las Igs poliméricas, el gran predominio de células positivas en los tests - de afinidad demostrado en la mayoría de las mucosas --

(BRANDTZAEG, 1973) sugiere que prácticamente toda la IgA originada en estas estructuras es polimérica.

Como se discutirá más adelante en este trabajo, es posible que exista un bombeo constante y selectivo de IgA polimérica del suero hacia la secreciones a través del parénquima hepático que actuaría activamente en contra de un gradiente de concentración, manteniendo un bajo nivel de concentración de estos polímeros en el suero y contribuyendo al "pool" de IgA S en las secreciones.

-----



Pag. 16

OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

A pesar de que desde hace muchos años se conoce - la existencia en el suero humano normal de una fracción de IgA de peso molecular elevado, hay muy pocos datos -- acerca de la naturaleza, propiedades fisicoquímicas, y - significación fisiológica de esta IgA, así como de sus - posibles implicaciones patológicas.

Nosotros hemos investigado todos estos aspectos - en un programa de trabajo de tres años de duración, cuyos objetivos fueron cronológicamente los siguientes:

En primer lugar investigar la naturaleza de esta fracción de la IgA sérica, en orden a demostrar su carácter polimérico lo cual había sido previamente cuestionado por otros investigadores.

Una vez confirmado el carácter polimérico de esta IgA, el siguiente objetivo fué analizar varias de sus -- propiedades inmunológicas como su contenido en cadena J, sus interacciones con el CS "in vitro", y la formación de complejos no inmunes con otras proteínas como la albúmina y la alfa A-T.

Seguidamente investigamos su significación fisiopatológica en relación con el sistema hepatobiliar.

Basándonos en resultados recientes obtenidos en - roedores que sugieren una función activa del parénquima hepático en el aclaramiento selectivo de la IgA del suero a las secreciones, analizamos los niveles séricos de IgA polimérica y monomérica en un enfermo de ictericia -

obstructiva antes y después de la remisión espontánea -  
de la obstrucción biliar.

La cuantificación de la IgA polimérica en el sue  
ro de enfermos cirróticos y el exámen de la IgA que se  
deposita en los glomérulos renales de muchos de estos -  
pacientes, fueron programados con objeto de investigar  
las posibles implicaciones ~~patológicas~~ a que podrían dar  
lugar el fracaso de esta función hepática y la acumula-  
ción de estos polímeros en la circulación.

-----

MATERIAL Y METODOS

En la primera etapa de nuestro trabajo, utilizamos suero fresco de sujetos normales procedente de personal de laboratorio incluyendo sujetos de diferentes países y razas. Muestras individuales de cada uno de los sueros en volúmenes de 50 ml., fueron empleadas para el aislamiento y caracterización de la IgA polimérica del suero normal.

Antisueros específicos contra las diferentes clases de inmunoglobulinas, cadena J y CS fueron obtenidas por KOBAYASHI (1973, a y b); y antisueros específicos anti albúmina y anti alfa A-T se adquirieron de Behringwerke (Marburg).

I.E.F., doble difusión y electroforesis, se realizaron en geles de agarosa con técnicas "standard".

Las determinaciones cuantitativas de IgA, se realizaron con un inmunoensayo automático por nefelometría (Technicon (R)), empleando un "pool" de suero humano normal como "standard".

Para la obtención de un inmunosorbente anti IgM, se acopló la fracción IgG de un suero de conejo anti IgM a sepharosa 4B (R) aminada, activada con CnBr, utilizando glutaraldehído como reactivo bifuncional, según la técnica original de CAMBIASO (1975).

Una preparación de CS libre fue obtenida a par--

tir de calostro (KOBAYASHI 1973 a), y marcada con  $I^{125}$  - por el método de la cloramina T (Mc CONAHEY, 1966).

La filtración en gel se realizó en columnas de Ultrogel (R): dimensiones 100x6 cm., o sephacryl S 200 (R) dimensiones 60 x 2,5 cm en tampón Tris ClH 0,02 M, Cl Na 2 g% a pH 8 con Na  $N_3$  al 0,1%.

La técnica de inmunodifusión radial (MANCCINI, -- 1963), se utilizó para analizar la distribución de las Igs en las fracciones eluidas de las cromatografías en Ultrogel.

Para la detección de cadena J en las preparaciones de IgA pol obtenidas por cromatografía de S H N, estas fueron reducidas y alquiladas en medio de-naturante (KOBAYASHI, 1975), en las condiciones siguientes: a 0,5 ml de muestra conteniendo 1,3 mg de IgA se añadió guanidina ClH, hasta una concentración 6 M, tamponando seguidamente con Tris sólido a pH 8,2. La reducción se hizo con DTT 30mM a 37° seguida de alquilación con I.A. 70 mM. La muestra así tratada fué dializada frente a  $CO_3HNNH_4$  al 1%, liofilizada y finalmente disuelta en 0,3 ml de urea 3 M a pH 7. Para identificar la cadena J liberada, se utilizaron técnicas de inmunoprecipitación (I.E.F. y doble difusión en gel) frente a un suero específico anti-cadena J, y la electroforesis analítica en gel de urea alcalina (KOSHLAND 1977).

En un intento de cuantificar la cantidad de cadena J liberada de las preparaciones de IgA por reducción, diluciones progresivas de las muestras reducidas fueron

depositadas en los pocillos de una placa de agarosa con teniendo suero anti cadena J, y los anillos de precipitación se compararon con los correspondientes a una preparación "standard" de cadena J obtenida de una proteína IgM monoclonal.

La afinidad de las preparaciones de IgA "pesada" por el CS "in vitro", fué investigada por dos métodos distintos: (a) Incubación "in vitro" de ambos reactivos y separación cromatográfica del CS libre y ligado: Un ml de la preparación (aproximadamente 7,5 nanomoles de IgA) se incubaron una hora a 37° y toda la noche a 4° con 50 microgramos de CS libre marcado con  $I^{125}$  (aproximadamente 0,7 nanomoles). La mezcla fué filtrada por una columna de Sephacryl S 200 previamente calibrada con IgA "pesada", IgA mon, y CS libre. La distribución de la IgA y del CS en las fracciones eluidas fué analizada por difusión en gel y radio difusión frente a los correspondientes antisueros.

(b) En otros experimentos alícuotas de IgA "pesada" e IgM 19 S purificada, se incubaron separadamente con CS libre marcado con  $I^{125}$  en concentraciones equimolares 1 hora a 37° y seguidamente se colocaron sobre gradientes isoquinéticos de sacarosa (5% al 26,8%) siendo la concentración final de sacarosa al fondo de los tubos de 19%, y se ultracentrifugaron en las siguientes condiciones experimentales: velocidad 28.000 r.p.m., tiempo - 16 horas, temperatura 20°C, volumen de muestras 5 ml rotor SW 65. Al final de la ultracentrifugación se recogieron

gotas del fondo de los tubos y se determinó la distribución de la radioactividad en cada fracción de cuatro gotas en un contador gamma.



En la segunda etapa analizamos algunas propiedades de la IgA polimérica del suero comparativamente con las observadas con otras inmunoglobulinas poliméricas:

(A) Contenido en cadena J: - en un primer experimento intentamos la estimación directa de la cantidad de cadena J liberada después de reducir nuestra preparación de IgA polimérica con DTT 30 mM e inmediatamente alquilada con IA, por inmuno difusión radial, utilizando como "standard" una preparación de cadena J purificada a partir de IgM monoclonal (KOBAYASHI -- 1975). En otro experimento cantidades equimolares de IgM 19S (900.000 daltons), e IgA pol purificada de -- suero normal, fueron reducidas y alquiladas como en -- el experimento anterior, y la liberación de cadena J en ambas preparaciones fué estimada comparativamente por difusión radial con suero monoespecífico anti cadena J.

(B) Extensión y cinética de la formación de enlaces disulfuro entre el CS y la IgA pol del suero -- normal. - Preparaciones de IgA pol fueron obtenidas de suero normal por filtración en gel seguida de inmunosorción con anti IgM (ver pag. 20).

CS libre fué obtenido a partir de calostro por cromatografía de afinidad, empleando un inmunosorbente IgM (UNDERDOWN 1977): suero de calostro (100 ml) fué obtenido por precipitación con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  a semisaturación, dializado frente a un tampón de citrato fosfato

0,01 M pH 6,8 y finalmente diluido diez veces en este -  
tampón conteniendo 0,25 mg de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2\text{Fe}$  por ml de lac-  
to suero diluido. Un inmunosorbente fué preparado aco-  
plando IgM monoclonal a Sepharosa aminada por la técni-  
ca de CAMBIASO (1975) a la concentración de 25 mg de --  
proteína por ml de gel. El inmunosorbente fué incubado  
con el suero de calostro tres horas a 4° y seguidamente  
la mezcla fué empaquetada en una columna de vidrio (30  
por 1,5 cm). Las proteínas no absorvidas fueron eluí-  
das con PBS pH 7,4 y el CS ligado a la IgM insolubiliza-  
da, disociado con guanidina 5M a 4°C. La preparación --  
así obtenida estaba contaminada con mínimas cantidades  
de lactoferrina no mostrando ninguna otra proteína con-  
taminante por I.E.F. La cantidad total de CS recuperada  
fué de 12,3 mg estimada por espectrofotometría, lo que  
supone un rendimiento muy elevado si se compara con el  
que se obtiene con otras técnicas.

Marcaje del CS. 2mg de CS en un ml de tampón ---  
 $\text{PO}_4\text{H}$  pH7, se marcaron con 200 microcurios de  $\text{I}^{125}$  por -  
el método de la cloramina T (Mc CONAHEY 1966).

Las concentraciones molares de IgA pol y CS li-  
bre marcado, fueron determinadas asumiendo que un mg de  
CS equivale a 13 nanomoles, y un mg de IgA dímerica a -  
tres nanomoles, partiendo de los respectivos pesos mole-  
culares.

Test de afinidad por el componente secretor:  
Alicuotas de 30 microlitros de CS marcado a doble con-  
centración molar respecto a la IgA se incubaron con ---

nuestras preparaciones de IgA pol en las siguientes condiciones experimentales:

<u>Muestra número</u>	<u>Tiempo de incubación</u>	<u>Temperatura</u>
1°	24. horas	2 h. 22°, resto a 4°
2°	2 horas	22°
3°	1 hora	22°
4°	30 min.	22°
5°	15 min.	22°
6°	5 min.	22°

La incubación de todas las muestras terminó simul táneamente y en ese momento se tomaron dos alicuotas de cada una para analizar separadamente (a) la cantidad de -CS incorporada a la IgA pol durante el proceso de incuba ción, y (b) la cinética de formación de enlaces covalentes entre ambas moléculas.

Para (a), 6 microlitros de cada una de las mues tras se colocaron por triplicado en pocillos de una pla ca de difusión radial con suero anti IgA incorporado en el gel a la dilución 1/200. Los pocillos habían sido pre viamente rellenos con un exceso de CS libre diez veces molar (no marcado), al objeto de bloquear la incorpora ción de CS marcado a la IgA pol durante la difusión. A las 48 horas, la placa fué lavada exhaustivamente con sa lina y procesada para autoradiografía. La radioactividad incorporada en los anillos de precipitación fué determi nada en un experimento idéntico recortando los anillos - y midiendo la radioactividad en un contador gamma.

Para (b), alícuotas de 20 microlitros de cada una de las muestras, fueron colocadas en geles de poliacrilamida preparados al 5% en urea 8M y SDS al 2%. Una muestra de CS I<sup>125</sup> fué colocada en un cilindro de poliacrilamida con objeto de identificar la posición del CS libre al final de la electroforesis. Todas las muestras fueron preparadas en SDS al 2% conteniendo sacarosa y azul de bromofenol como indicador. La electroforesis fué realizada durante cuatro horas a una intensidad de 10mA por cilindro de gel.

Terminada la electroforesis los geles fueron cortados longitudinalmente; unos cortes se tiñeron con negro amido para identificar las bandas de proteínas, otros fueron procesados para autoradiografía, y otros se seccionaron en pequeños cortes transversales para estimar la radioactividad en un contador gamma.

(C)- Para investigar la presencia de complejos no inmunes de IgA pol y otras proteínas del suero, examinamos sistemáticamente la presencia de labúmina y alfa A-T en nuestras preparaciones de IgA pol por I.E.F. y doble difusión en gel frente a los antisueros correspondientes. En algunos experimentos se emplearon condiciones suaves de reducción (10 mM DTT) con objeto de disociar estos complejos.

-----

En la tercera etapa, investigamos la participación del sistema hepatobiliar en la fisiología de la -- IgA pol del suero analizando las variaciones de los niveles séricos de IgA pol y mon en un enfermo de ictericia obstructiva.

Un varón de 73 años P.A.A., ingresó en el hospital con un cuadro de dolor abdominal ictericia y fiebre de un mes de evolución. A la exploración solamente destacaban la ictericia y una mínima hepatomegalia. Los datos del laboratorio mostraron una bilirrubina total de 30,2 mg por cien ml, con 18,9 mg% de directa, fosfatasa alcalina de 491 mU/ml, (SGOT) 36 mU/ml, (SGPT) 48 mU/ml, (LAP) 24mU/ml; proteinograma con 3g/dl de albúmina, --- 1,95 g/dl de gamma globulina y 7 g de proteínas totales; lípidos totales 1.040 mg/dl, colesterol 300 mg/dl; Hb<sub>s</sub>Ag negativo.

A las dos semanas el enfermo tuvo una remisión espontánea de la obstrucción biliar. La bilirrubina total bajó a 3,5 mg/dl; una colangiografía intravenosa -- realizada en ese momento demostró la presencia de un -- cálculo en el conducto biliar. El enfermo no aceptó la realización de una laparotomía.

#### Estudios inmunológicos:

Dos muestras de 20 ml de suero fueron obtenidas al momento del ingreso y después de la remisión espontánea de la ictericia, y en ellas fueron determinadas el contenido de IgG, IgM, e IgA, y las proporciones relativas de IgA pol frente a IgA mon, e IgA pol frente a IgA total. Un "pool" de suero normal fue igualmente estudiado como referencia.

Para las cuantificaciones de IgG e IgM, utilizamos el método de difusión radial empleando placas comerciales (Partigen Behringwerke).

Para los estudios sobre la IgA utilizamos un mismo lote de antisuero anti IgA obtenido de Operon (Zaragoza) cuya especificidad fué demostrada por doble difusión en gel frente a proteínas purificadas de las diferentes --- clases de Igs.

La separación e identificación de la IgA pol del suero fueron realizadas por filtración en gel (como en la primera etapa de este trabajo) e inmunodifusión radial. Con objeto de reducir al mínimo la heterogeneidad de tamaño que constituye un serio problema en la cuantificación de proteínas por este método, todas las fracciones eluidas fueron reducidas con 2 mercaptotanol 0.2 M, 1 h. a temperatura ambiente antes de ser probadas por difusión radial con anti IgA.

Con objeto de cuantificar las proporciones relativas de IgA pol e IgA mon, a las 48 horas de difusión - las placas se lavaron exhaustivamente se tiñeron con negro amida y dos diámetros de cada uno de los anillos de precipitación se midieron con un visor ampliador ( $\times 10$ ). Las superficies correspondientes a la IgA pol e IgA mon, se calcularon independientemente, y las proporciones relativas de IgA pol /IgA total, e IgA pol/IgA mon, se determinaron a partir de éstos datos.

La presencia de CS en las fracciones de IgA pol fué investigada en la primera muestra por I.E.F. e inmuno difusión frente a sueros monoespecíficos anti CS y anti

Pag. 30

IgA S obtenidos de DAKO, antes y después de reducir la  
preparación con 2 mercaptoetanol 0.1 M.

En la última parte investigamos el posible patogénico de la acumulación de IgA pol en el suero. - Para ello tomamos como posible modelo de lesión secundaria al depósito de IgA pol, la glomerulonefritis con depósitos de IgA, frecuentemente observada en enfermos cirróticos; investigamos la naturaleza de esta IgA y cuantificamos los niveles de IgA pol en el suero de algunos de estos enfermos.

Cuatro biopsias renales de enfermos cirróticos se obtuvieron inmediatamente "post-mortem", y se guardaron congeladas en N líquido hasta el momento de su estudio. Los diagnósticos anatomopatológicos y los principales datos serológicos fueron los siguientes:

L L D: Cirrosis hepática micronodular con actividad (+) de etiología alcohólica. Ag HB<sub>s</sub> (+), C<sub>3</sub>=30, C<sub>4</sub>=24, C<sub>1</sub>q superior a 200, C<sub>5</sub>=54, C<sub>9</sub>=34, C<sub>3</sub>PA=6,25, C<sub>1</sub> inactivador = 26.

P M G: Cirrosis hepática micronodular con actividad (+) de etiología alcohólica Ag HB<sub>s</sub> (-), C<sub>3</sub>=42, C<sub>4</sub>=50, C<sub>1</sub>q superior a 200, C<sub>5</sub>=66, C<sub>9</sub>=44, C<sub>3</sub>PA=28, C<sub>1</sub> inactivador = 110.

J G C: Cirrosis hepática micronodular con actividad (±) de etiología idiopática, AgHB<sub>s</sub> (-), C<sub>3</sub>=30, C<sub>4</sub>=40, C<sub>9</sub>=24, C<sub>3</sub>PA=30, C<sub>1</sub> inactivador=82.

A M S: Cirrosis hepática micronodular sin actividad de etiología alcohólica C<sub>3</sub>=34, C<sub>4</sub>=25.



Una biopsia renal fué obtenida por lumbotomía de una enferma (P.I) afecta de glomerulonefritis con depósitos de IgA tipo Berger; un cilindro de riñón normal, fué obtenido por biopsia operatoria en un enfermo intervenido quirúrgicamente de pielolitiasis.

Muestras de veinte ml de suero, fueron obtenidas de 10 enfermos de cirrosis hepática y de la enferma P.I. afecta de glomerulonefritis tipo Berger. Un extenso "pool" de sueros normales fué utilizado como referencia en estos estudios.

Antisueros: sueros de conejo fluoresceinados - anti CS, IgA e IgM fueron obtenidos de DAKO, y anti-sueros precipitantes anti CS y antisuero de calostro se obtuvieron de la misma fuente. Los sueros anti inmunoglobulinas fluorescentes se emplearon a diluciones apropiadas de acuerdo con titulaciones previas "en tablero de ajedrez" frente a un suero conocido con anticuerpos antinucleares. El suero anti CS se utilizó a la dilución 1/15 tras experimentos previos de inmunofluorescencia en una biopsia intestinal. La monoespecificidad de todos los antisueros empleados, fué confirmada por inmunodifusión.

CS: Se utilizaron dos muestras diferentes. Una de ellas fué obtenida por cromatografía de afinidad - (ver pag. 24); la otra fué un obsequio del Dr. Haupt (Marburg). Ambas preparaciones fueron puras por inmunodifusión frente a anti sueros contra el CS y suero de calostro, y daban entre sí una reacción de identidad completa enfrentadas con suero anti CS en placas de Ouchterlony.

Estudio de las biopsias renales por inmunofluorescencia: Cortes de 4 micras de cada una de las biopsias se realizaron en el criostato, y después de fijar bajo una corriente de aire, se tiñeron con sueros fluorescentes anti IgG, IgA, IgM C<sub>3</sub> y C<sub>1</sub>q, 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda; las preparaciones se lavaron seguidamente con tres cambios de -- PBS PH7,2, se montaron con glicerol tamponado y finalmente se observaron en un microscopio Zeiss equipado con lámpara UV, epiiluminación y los adecuados filtros de excitación y bloqueo. La fluorescencia observada -- se expresó de acuerdo con su localización, patrón, e intensidad de fluorescencia, sobre una escala de 0 a 4 cruces según la terminología propuesta por HYMAN(1973). Las secciones con nula o mínima tinción fluorescente se consideraron negativas.

Test de afinidad por el CS: Para investigar la naturaleza de los depósitos de IgA en las biopsias hemos aplicado el test de afinidad por el CS "in vitro" (BRANDTZAEG, 1973) con algunas modificaciones: secciones de las biopsias renales de todos los enfermos se -- incubaron "in vitro" con CS libre 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda, se lavaron tres veces con PBS para eliminar el CS no fijado y se incubaron -- con antisuero fluorescente anti CS. Las secciones se -- lavaron de nuevo con PBS para eliminar el antisuero, -- se montaron con glicerol tamponado y se observaron por inmunofluorescencia.

Para confirmar la especificidad de fijación del CS se aplicaron los siguientes controles: (A) secciones de las biopsias de cada uno de los casos, fueron -- incubadas directamente con el suero fluorescente anti CS (I F directa) y (B) la biopsia de riñón normal fué

estudiada en el test de afinidad exactamente igual que las biopsias obtenidas de cirróticos.

La cinética de la formación de enlaces disulfuro entre la IgA depositada y el CS añadido "in vitro" fué investigada en las biopsias incubando secciones de cada uno de los casos con CS como se ha -- descrito en el test de afinidad, pero interrumpiendo el periodo de incubación a diferentes tiempos con rápidos lavados en guanidina 5 M tamponada a pH 7,4 para romper los enlaces no covalentes; después de lavar exhaustivamente con PBS las secciones se incubaron con suero fluorescente anti CS, se lavaron de -- nuevo y se observaron por inmunofluorescencia.

-----

Pag. 35

- RESULTADOS -

En este apartado se presentan separadamente - los resultados correspondientes a las diferentes etapas enumeradas en el capítulo de objetivos.

#### PARTE I

Aislamiento y caracterización de la IgA pol - del suero humano normal:

Una de nuestras primeras observaciones fué la buena resolución de la IgA del suero en ultrogel ACA 34 (Fig. 1). El análisis de las fracciones eluidas, por difusión radial mostró que la IgA tenía una distribución bimodal, estando el primer pico constituido por polímeros (en su mayoría dímeros) de IgA y el segundo por IgA mon de tamaño 7S.

Las fracciones del primer pico concentradas - mostraban por electroforesis una banda de IgA claramente visible, grandes cantidades de haptoglobina y alguna otra proteína contaminante de movilidad alfa; la presencia de IgM era particularmente inconveniente debido a que por su carácter polimérico comparte con la IgA pol las propiedades que deseábamos investigar en nuestras preparaciones; este problema fué - resuelto al eluir las muestras por un inmunosorbente anti IgM, tras de lo cual no se detectó en ninguna de ellas la presencia de esta clase de Ig por doble difusión en gel a las 72 horas de incubación frente al antisuero específico.

La cantidad total de IgA en la preparación de IgA "pesada" se estimó en 7,8 mg por inmunoensayo ne

felométrico (un método que se ha demostrado que es independiente del tamaño molecular del antígeno). Esta cantidad representaba el 9,7% del total de la IgA en el suero de partida.

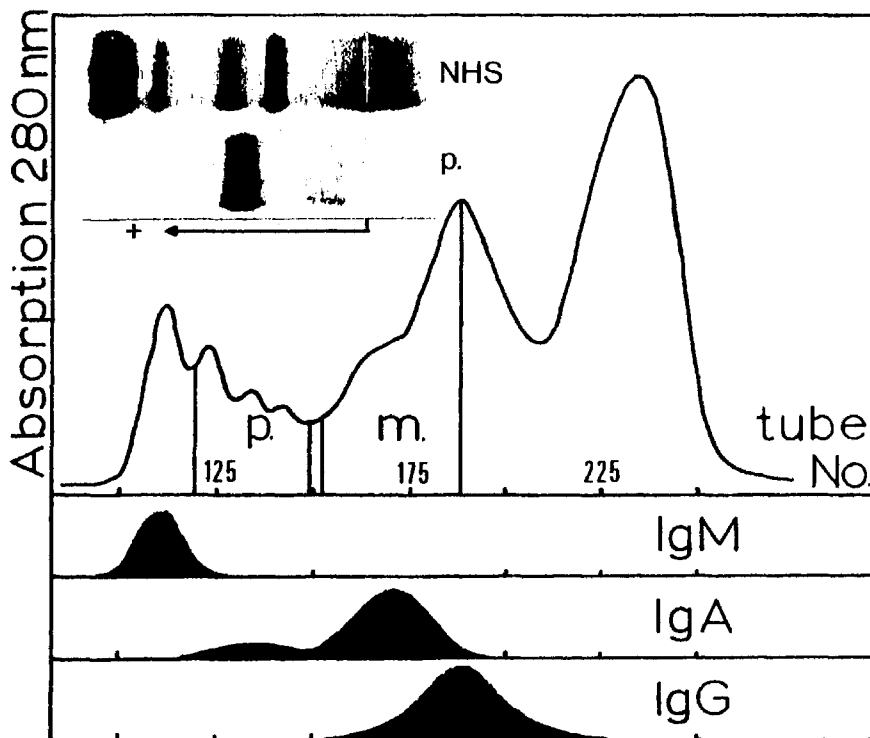
En orden a caracterizar las preparaciones de IgA "pesada", investigamos la presencia de cadena J y la afinidad por el CS "in vitro" como se describe en el capítulo de métodos.

Una banda de migración anódica fue observada en la electroforesis en gel de urea alcalina correspondiente a cadena J liberada de nuestra -- preparación de IgA por reducción y alquilación -- (no mostrada). La misma proteína precipitaba específicamente ante un suero anti cadena J hasta la dilución 1/16 por doble difusión en gel (fig. 2) y daba una reacción de identidad completa con una preparación de cadena J purificada a partir de -- IgM monoclonal (KOBAYASHI, 1975). En la I.E.F., se observaron signos de proteólisis en esta preparación de referencia, a consecuencia de su prolongado almacenamiento.

La afinidad por el CS I<sub>125</sub> "in vitro" fue demostrada por dos técnicas diferentes: separación cromatográfica del CS libre y ligado a la IgA, y ultracentrifugación en gradiente de densidades. -- Con el primer método la radioactividad fue detectada en su mayor parte (88%) en las fracciones -- donde se eluía la IgA "pesada" (fig. 3) y estaba concentrada en los precipitados IgA-anti IgA (fig. 4). Resultados todavía más demostrativos se con--

siguieron por ultracentrifugación (fig. 5). Como puede observarse la mayor parte de la radioactividad se recogió en las fracciones correspondientes a coeficiente de sedimentación 20,6 S y 11,7 S en las muestras correspondientes a incubaciones de - CS marcado con IgM 19 S y con las preparaciones - de IgA "pesada". La radioactividad de una preparación de CS libre marcado utilizada como referencia, se recogió en las fracciones correspondientes a un coeficiente de sedimentación 4,8S.

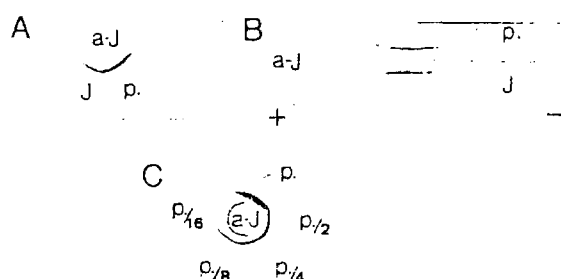
Figura 1



- Distribución de las diferentes clases de Igs en las fracciones eluidas en ultrogel ACA 34.
- Electroforesis en gel de agarosa del suero de partida (NHS), y del "pool" de fracciones 110 a 150. (p). An<sub>o</sub>do a la izquierda.

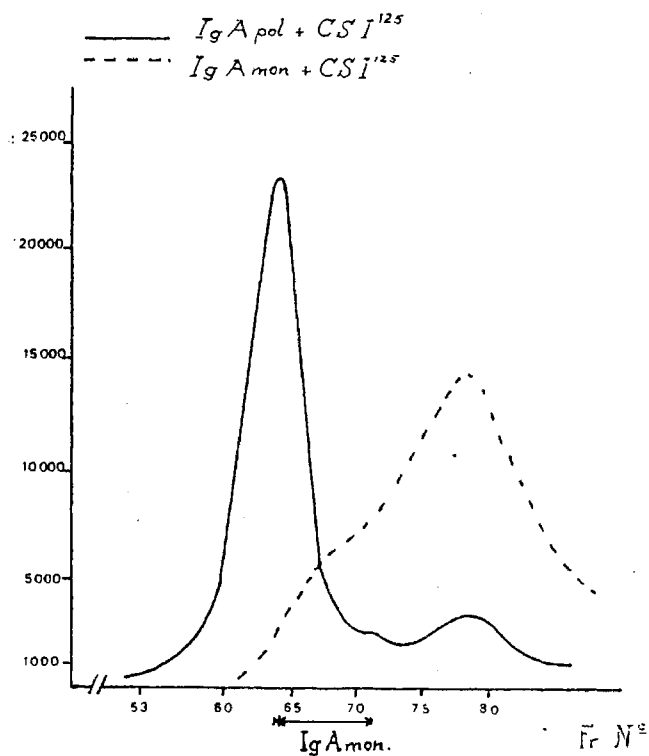


Figura 2



- A.- Preparación de IgA pol reducida y alquilada, y cadena J purificada frente a un suero específico anti cadena J. Obsérvese la reacción de identidad completa.
- B.- I.E.F. de ambas preparaciones frente al mismo antisuero. Obsérvense los fragmentos proteolíticos en la línea de precipitación correspondiente a la preparación de cadena J - de referencia.
- C.- Análisis semicuantitativo de la liberación de cadena J por reducción de la preparación de IgA pol.

Figura 3



- Cromatografía en Sephacryl S 200 de la preparación de  $IgA_{pol}$  incubada con  $CS I^{125}$ . Distribución de la radioactividad en las fracciones eluidas.

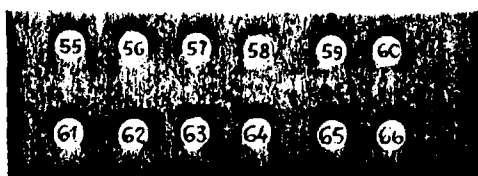
Con trazado discontinuo se representa el resultado de la incubación del  $CS I^{125}$  con una paraproteína  $IgA_{mon}$ .

- Distribución de  $IgA$  en las fracciones cromatográficas analizadas por doble difusión en gel frente a un suero anti  $IgA$ . →
- Auto radiografía de las placas de Ouchterlony. →

Figura 4

Ouchterlony test  
suero anti IgA

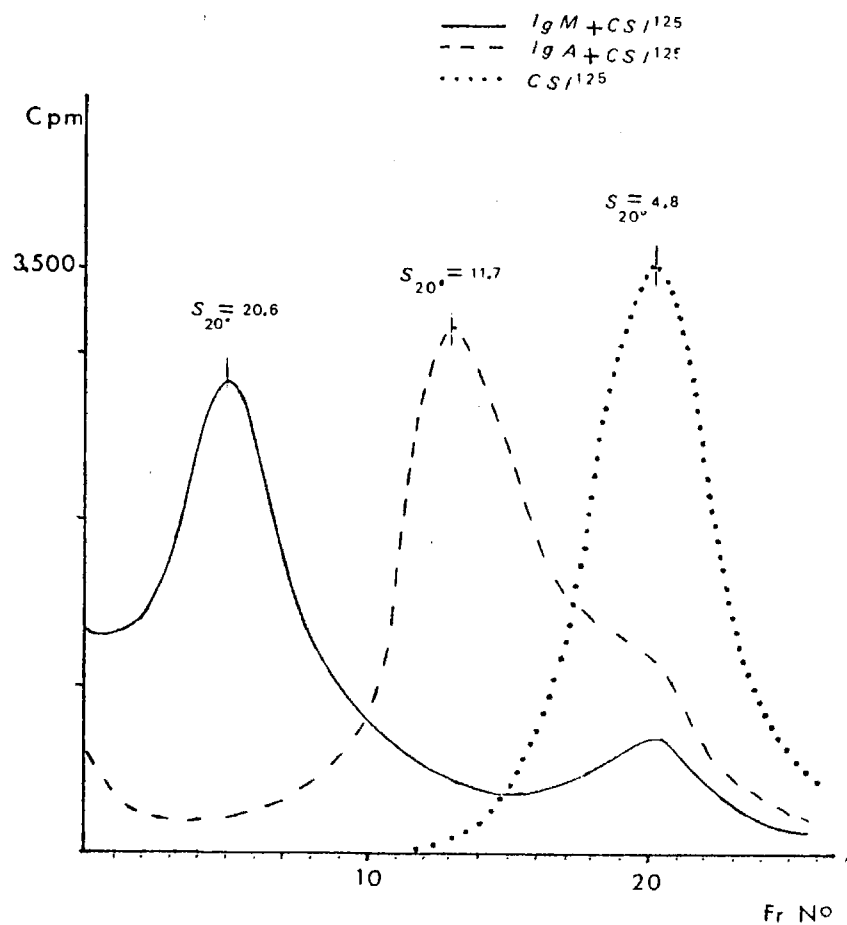
55 56 57 58 59 60  
61 62 63 64 65 66  
67 68 69 70 71 72  
73 74 75 76 77 78  
79 80 81 82 83 84  
85 86 87 88



Leyenda en página anterior.

Figura 5.

Pag. 44



Distribución de la radioactividad en las fracciones obtenidas de los gradientes con IgM monoclonal, e - IgA pol incubadas "in vitro" con CS  $I^{125}$  en concentraciones estequiométricas. Un gradiente de CS  $I^{125}$  libre fué incluido como referencia.

Los coeficientes de sedimentación correspondientes a los diferentes "picos" están representados.

PARTE II:

Cuantificación de cadena J presente en las preparaciones de IgA pol.

La cuantificación directa de la cadena J liberada por reducción fué intentada por difusión radial; sin embargo la existencia de proteólisis en la preparación de cadena J utilizada como referencia (ver pag. 41 I.E.F.), nos impidió una estimación fidedigna de los resultados observados.

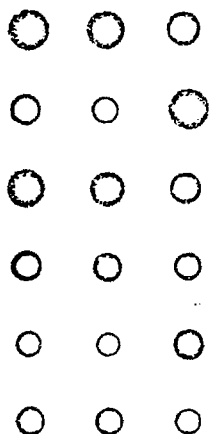
En otro experimento se analizó comparativamente por difusión radial, la cantidad de cadena J liberada por reducción de la IgA pol y de IgM monoclonal; los diámetros de los anillos de precipitación correspondientes a la cadena J liberada de la IgA pol fueron más amplios que los correspondientes a las mismas diluciones de la IgM reducida (fig. 6 y 7). Sin embargo la expresión de los resultados en esta forma resulta engañosa debido a que a idéntica concentración en mg de proteína debe de existir un mayor número de moléculas de IgA pol que de IgM. Asumiendo que la mayoría de las moléculas de IgA de nuestras preparaciones son dímeros de un peso mol. de 335.000 daltons construimos una gráfica representativa de la liberación de cadena J expresada en términos de molaridad (fig. 8). Las dos líneas no son estrictamente paralelas lo que refleja probablemente la heterogeneidad de los polímeros de IgA en su contenido en cadena J.

La cinética de la formación de complejos IgA pol - CS I<sup>125</sup> "in vitro", se investigó como se detalla en la pag. 25; una rápida formación de complejos fué observada "in vitro" que progresivamente se hizo más lenta durante la primera hora. El proceso continuó a un ritmo lento durante las 24 horas - del estudio (fig. 9 y 10).

La cinética de la formación de puentes disulfuro en los complejos IgA pol- CS I<sup>125</sup> analizada -- por electroforesis en medio denaturante, puso de manifiesto que la formación de estos enlaces covalentes se inicia muy rápidamente en el periodo de incubación (fig. 11). Un 15% de la radioactividad presente en el CS apareció en la porción superior del gel en la posición de la IgA pol en la muestra incubada "in vitro" durante 5 minutos; al aumentar el tiempo de incubación se observó un aumento progresivo del CS ligado a la IgA por fuerzas covalentes con la -- disminución correspondiente del CS libre.

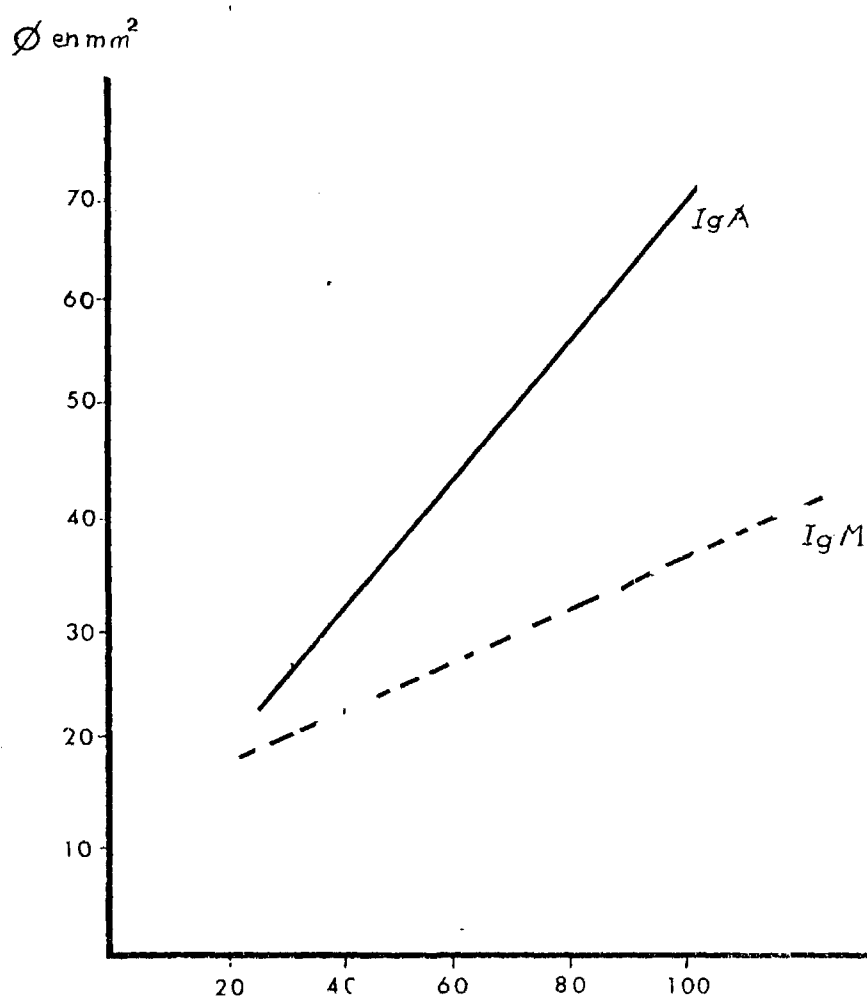
La formación de complejos no inmunes con -- otras proteínas del suero fué investigada sistemáticamente en todas las preparaciones de IgA pol, y en ellas se puso de manifiesto la presencia de complejos con albúmina y alfa A-T (fig. 12). Como fué señalado por HEREMANS (1960), estos complejos se forman a -- través de enlaces covalentes dissociables por reducción, como pudimos observar al tratar las preparaciones con DTT 10 m M.

Figura 6



Cuantificación de la cadena J liberada, por reducción completa de una preparación de IgA pol (parte superior de la placa) y de una paraproteína IgM (19 S), (parte inferior).

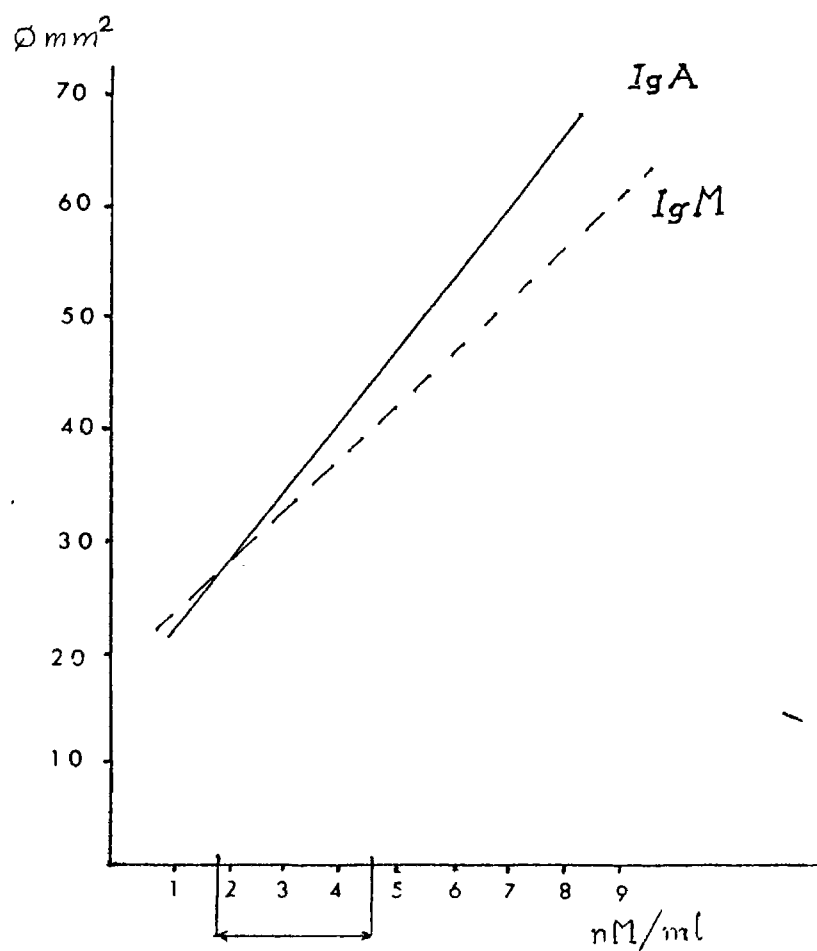
Figura 7



Representación gráfica de la cuantificación de cadena J por difusión radial en las preparaciones de  $\text{IgA}$  pol e  $\text{IgM}$  (19 S).



Figura 8

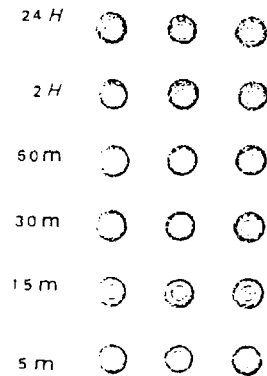


Representación estequiométrica del contenido en  
cadena J de las preparaciones de IgA pol e IgM (19 S).

Figura 9

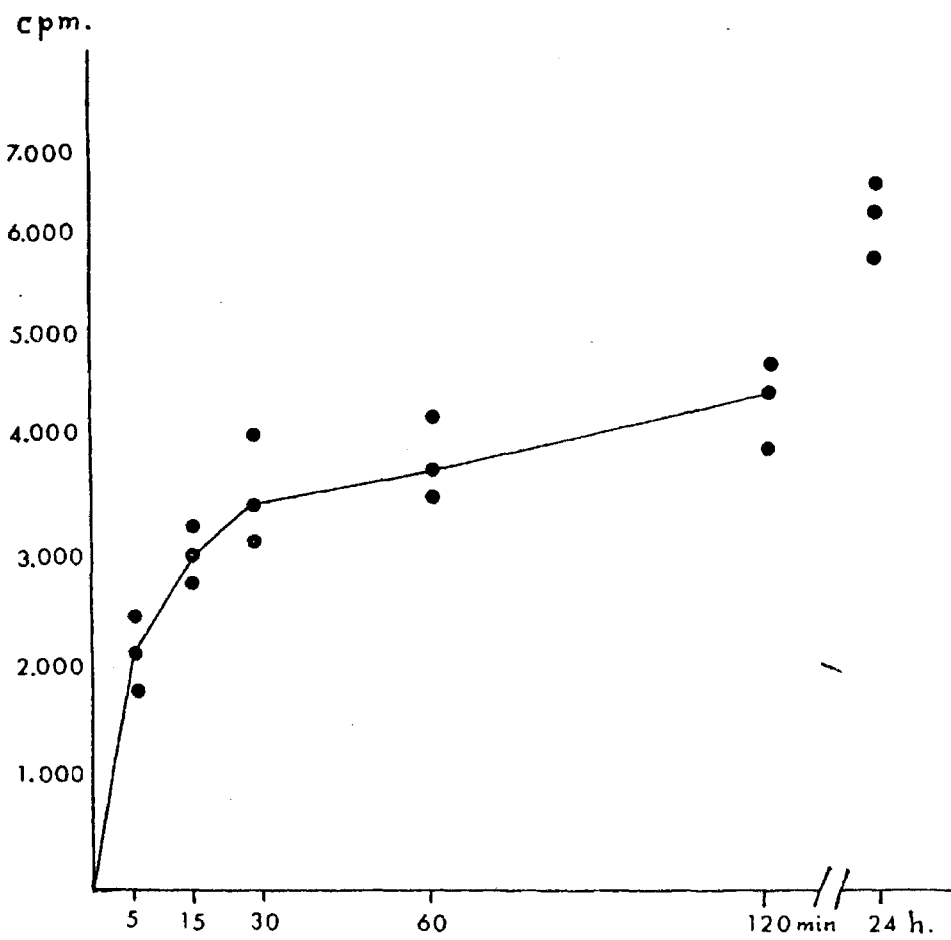
Cinética de la formación de complejos IgA por CS  
 $I^{125}$  "in vitro".

Figura 9



Autoradiografía de una placa de difusión radial  
 desarrollada con suero anti IgA: los pozillos -  
 (triplicados) fueron rellenados con 5 microlitros  
 de IgA por incubada por tiempos variables  
 con CS  $I^{125}$  en concentraciones estequiométricas.

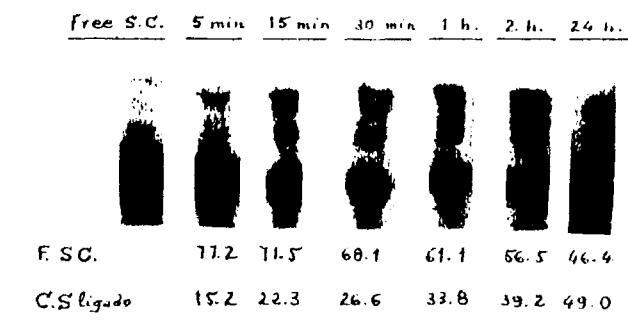
Figura 10



Representación gráfica de la radioactividad presente en los anillos de precipitación de la placa presentada en la figura anterior.

Figura 11

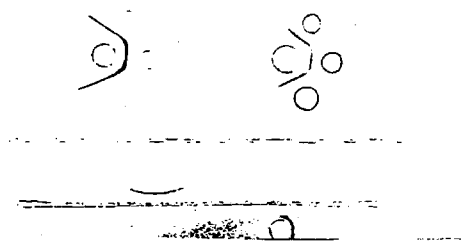
Cinética de la formación de enlaces covalentes en los complejos formados "in vitro" al incubarse IgA pol con CS 1125.



Autoradiografía de geles de poliacrilamida después de la electroforesis analítica en medio de naturante de preparaciones de IgA pol incubadas "in vitro" por tiempos variables con el CS marcado.

Figura 12

Formación de complejos IgA pol/ Albúmina e IgA pol/alfa A-T



- Arriba a la izquierda: Reacción de cantidades progresivas de IgA pol con un suero anti albúmina en placa de Ouchterlony.
- Arriba a la derecha: Lo mismo, frente a un suero anti alfa A-T.
- Abajo: I.E.F., frente a un suero anti albúmina: pocillo superior albúmina humana; pocillo inferior, preparación de IgA pol; obsérvese el cambio de movilidad electroforética de la albúmina ligada a la IgA.

PARTE III:

Las proporciones de IgA "pesada" respecto a la IgA mon y al total de IgA en tres diferentes -- muestras de suero normal (tomadas de un amplio --- "pool" de sueros normales) están presentadas en la tabla 1: el valor medio de IgA pol respecto a la - total fué de 9,82% y la variación entre muestras - inferior al 1,5%. No intentamos hacer cuantifica-- ciones en términos absolutos pero teniendo en cuen-- ta las cifras normales de IgA total en el suero, - valores de IgA "pesada" entre 15 y 25 mg% ml de -- suero deben de ser consideradas como normales.

El perfil de elución de las dos muestras -- de suero del enfermo icterico, están presentadas - en la fig. 13: en ella se incluye además el corres-- pondiente a la elución del suero normal en la mis-- ma columna y en idénticas condiciones experimenta-- les. Sobre impuesta en la fig. están representados los resultados de los test de difusión radial de - las fracciones correspondientes a las dos muestras del enfermo; como puede apreciarse la IgA mostró en ambas una distribución bimodal existiendo una neta separación cromatográfica entre las fracciones de IgA mon y las de la IgA "pesada"; en ningún caso - observamos anillos dobles o cambios de intensidad en los precipitados que hubieran dificultado la in-- terpretación de los resultados observados.

La concentración de las diferentes clases - de Igs y las proporciones relativas de IgA "pesada" /IgA total; IgA "pesada"/ IgA mon, en las dos mues-- tras del paciente y en el suero normal utilizado co-- mo control están presentados en la tabla 2; los da-- tos más relevantes fueron la elevada concentración de IgG en las dos muestras del paciente comparadas

con la cifra correspondiente en el suero normal y - la elevada proporción de la fracción de IgA "pesada", pero lo más significativo fué el descenso del nivel de la IgA "pesada" en la segunda muestra con respecto al observado en la primera.

Estas variaciones son más claramente observadas en la tabla 3, donde se recogen las diferencias proporcionales entre las muestras del enfermo; el dato más significativo fué la disminución selectiva de la fracción de IgA "pesada" en la segunda muestra; mientras que ésta fracción disminuyó un 22,3%, la variación observada en la IgA mon fué de un 3,1% es decir una proporción 7 veces menor.

La preparación de IgA "pesada" correspondiente a la primera muestra reaccionaba por difusión en gel e I.E.F. con antisueros anti IgA S y anti CS libre (fig. 14), y la reactividad con el suero anti-CS fué más evidente e intensa después de reducir la preparación en medio denaturante.

T A B L A N°1

<u>Muestra n°</u>	<u>IgA pol</u> <u>(mm<sup>2</sup>)</u>	<u>IgA mm</u> <u>(mm<sup>2</sup>)</u>	<u>IgA total</u> <u>(mm<sup>2</sup>)</u>	<u>POL/mom</u> <u>%</u>	<u>Pol/Total</u> <u>%</u>
1	10.166	86.792	96.958	11,71	10,48
2	7.746	74.812	82.558	10,35	9,38
3	14.239	106.764	121.003	13,34	11,77



T A B L A N° 2

	<u>Muestra 1</u>	<u>Muestra 2</u>	<u>Suero normal</u>
Bilirrubina total (mg/dl)	30,2	3,5	
Bilirrubina directa (mg/dl)	18,9	3	
IgG mg/dl	1.790	1.600	960
IgM mg/dl	138	130	152
% de IgA pol/mon	23,74	19,61	10,35
% de IgA pol/tot.	19,19	16,40	9,38

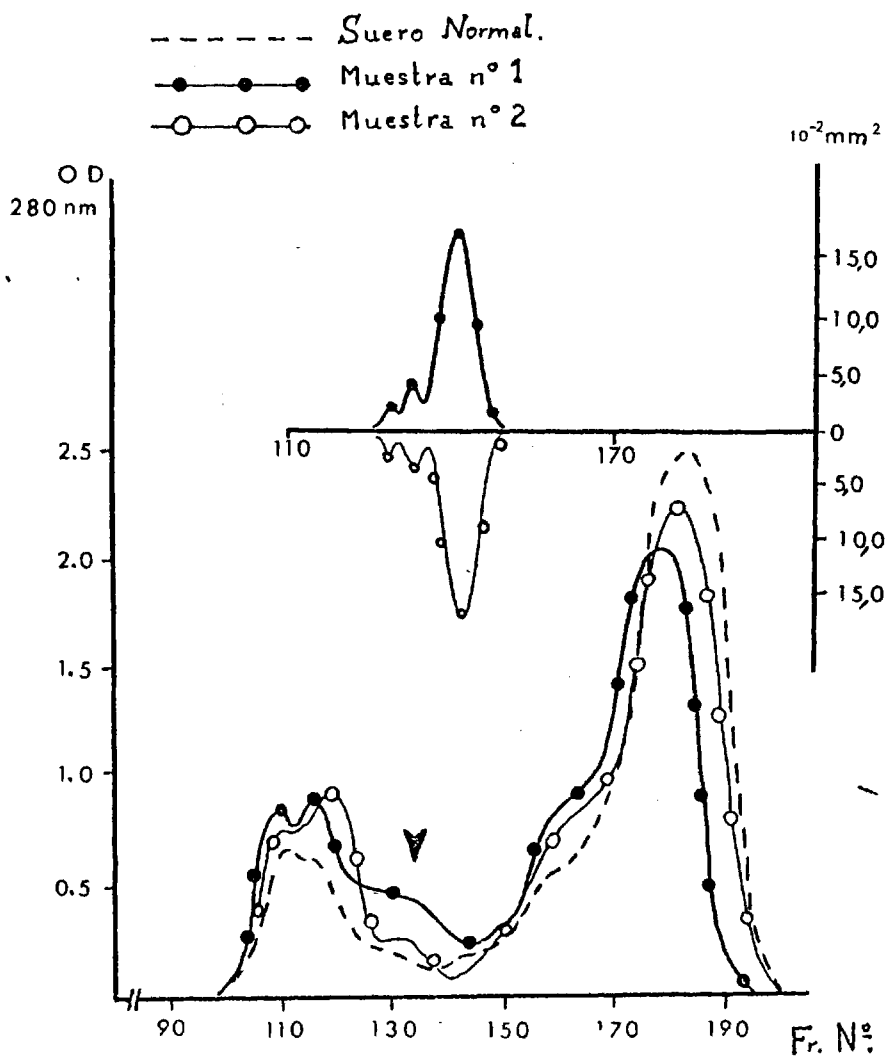
---

T A B L A N° 3

	<u>Muestra 1</u>	<u>Muestra2</u>	<u>Variación %</u>
IgApol (cm <sup>2</sup> )	3,84	2,98	-22,3
IgA mon (cm <sup>2</sup> )	1,61	1,56	-3,4
IgA total (cm <sup>2</sup> )	5,46	4,54	-16,7
IgG mg/dl	1790	1600	-10,6
IgM mg/dl	138	130	- 5,8

---

Figura 13

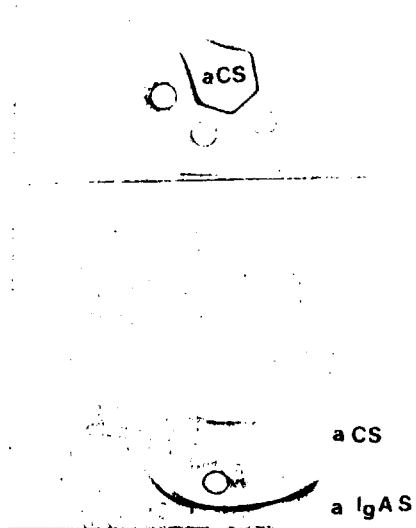


Cromatografía de 20 ml de suero del paciente P.A. (muestras 1 y 2) y, de suero normal en ultragel ACA 34.

Sobreimpuesta a los trazados cromatográficos está representada la distribución de la IgA en las fracciones eluidas en ultragel (muestras 1 y 2) determinadas por difusión radial.

La posición correspondiente a la máxima elución de IgA por se representa con una flecha.

Presencia de CS unido a la IgA pol en la 1ª muestra del paciente P.A.A.



Ouchterlony.- Diluciones progresivas de la IgA pol frente a un suero anti CS.

I.E.F.- Pocillo superior: preparación pura de CS. Pocillo inferior. IgA pol; antisueros anti CS y anti IgA S.

PARTE IV:

La significación fisiopatológica de los trastornos cuantitativos de la IgA por el suero, fue sugerida por los resultados observados en enfermos cirróticos.

Primeramente examinamos por inmunofluorescencia 4 biopsias renales de enfermos cirróticos con depósitos glomerulares de IgA. Los resultados están presentados en la tabla 4; los depósitos de Igs en el enfermo L.L.D. tenían una distribución periférica y afectaban a todos los glomérulos en forma difusa. En el enfermo P.M.G., también se observó una distribución predominantemente capilar que afectaba a la mayoría pero no a todos los glomérulos con un intenso predominio de IgA. La biopsia de J.G.C., mostró depósitos de Igs de diferentes clases con una localización periférica y mezcla de depósitos granulares finos y gruesos en las asas capilares. En el enfermo A.M.S., había también depósitos mesangiocapilares de Igs con predominio capilar.

El carácter polimérico de la IgA depositada en todos los casos fue demostrado en test de afinidad por el CS "in vitro", observandose intensa tinción fluorescente con el antisuero anti CS; un curioso cambio en el patrón de tinción se puso de manifiesto al comparar las secciones teñidas con el anti CS, con las teñidas con el suero anti IgA; en ningún caso se objetivó la presencia de CS en el me

sangio demostrándose exclusivamente en el ovillo capilar con una tinción granular predominantemente fina (figuras 15 y 16).

La especificidad de la fijación del CS fué confirmada con los contrales detallados en la pag. 33; en todos ellos los resultados del test fueron negativos lo que descartaba la existencia en las biopsias de IgA S o CS libre que hubiera podido interferir la realización e interpretación de los tests, así como la ausencia en el riñón normal de cualquier sustancia o estructura capaz de combinarse con el CS libre "in vitro".

En un experimento planeado para investigar la sensibilidad del test, incubamos diluciones -- progresivas del CS con secciones del enfermo J.G. C. El resultado está presentado en la tabla 5; -- una reacción positiva se puso de manifiesto con -- concentraciones superiores a 3 nanogramos de CS.

Dos de nuestros casos mostraban depósitos de IgM por I.F., lo cual complicaba la interpretación de los resultados con respecto a la naturaleza de la IgA depositada ya que los resultados positivos observados podrían deberse a la formación de complejos CS-IgM, pero esta posibilidad fué -- descartada al realizar el test en condiciones denaturantes; en estas condiciones la positividad -- permaneció inalterada en todos los casos.

En otro experimento, se investigó la ciné-

tica de la formación de enlaces covalentes entre la IgA depositada y el CS añadido: los resultados están presentados en la tabla 6; la guanidina impide la unión del CS si es añadida en los primeros minutos del periodo de incubación pero no afecta a la formación de complejos pasados -- los primeros 20 minutos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la segunda parte de este estudio sobre la cinética de la formación de complejos con IgA polimérica del suero (pag. 46).

Tras el tratamiento de las secciones con guanidina se observó un nuevo cambio en la tinción de los glomerulos con el suero anti CS; el patrón observado en este caso, fué un patrón capilar fino con depósitos continuos en las asas capilares de un aspecto "pseudo lineal" (fig.17).

La posibilidad de una relación entre la nefropatía IgA frecuentemente observada en los cirróticos y la acumulación de IgA pol en suero, parece reforzada por los resultados obtenidos al cuantificar las proporciones de IgA "pesada" en el suero de enfermos con cirrosis hepática (tabla 7), en la mayoría de ellos se observaron importantes aumentos de esta fracción de la IgA, que alcanzó en algún caso valores superiores al 40% de la IgA total. Desgraciadamente no pudieron ser determinados los niveles séricos de IgA "pesada" en los cuatro casos en que se buscaron depósitos de IgA pol por I.F. en las biopsias renales.

Un resultado que apoya indirectamente la -  
asociación de nefropatía IgA con la acumulación -  
de polímeros por fallo hepático, fué la negatividad del test de afinidad por el componente secretor en una enferma que mostraba depositos de IgA en los glomérulos, sin ningún signo de afectación hepática, y con una proporción de IgA "pesada" en el suero de 8,6% absolutamente normal.

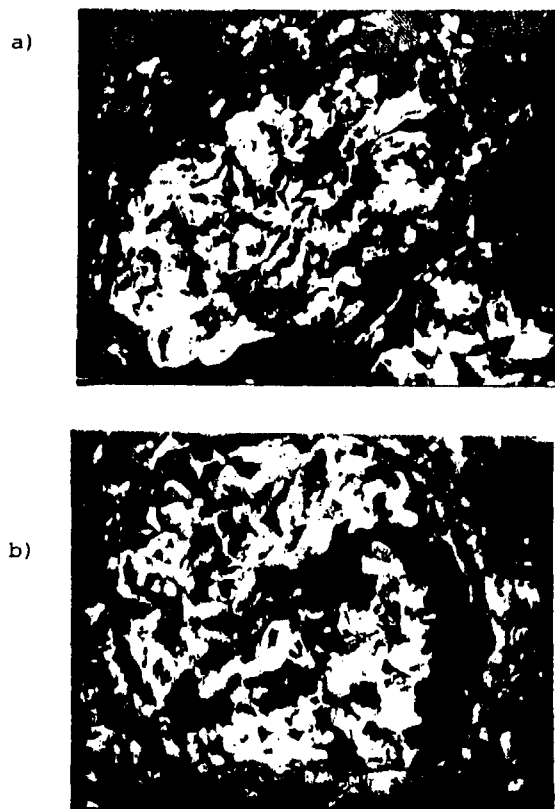
-----



TABLA 4      DATOS INMUNOHISTOLOGICOS

<u>Enfermo</u>	<u>C3</u>	<u>Clq</u>	<u>IgG</u>	<u>IgA</u>	<u>IgM</u>	<u>Localización y pa</u> <u>trón de los depó</u> <u>sitos de IgA.</u>
L.L.D.	+++	+++	0	+++	0	Generalizados, di fusos periféricos granulares.
P.M.G.	++	++	0	+++	0	Difusos focales - periféricos granu lares finos y grue sos.
J.G.C.	+	0	0	+++	+	Difusos focales, - granulares, mesan giocapilares.
A.M.S.	+	0	+	+++	+	Mesangiocapilares finos, difusos y - generalizados.

Figura 15



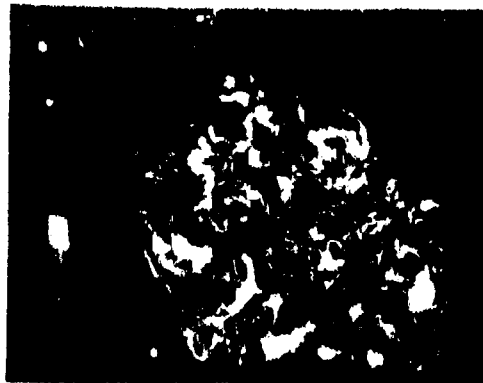
I.F. con anti IgA FITC.- a) biopsia L.L.D.  
b) biopsia J.G.C.  
Obsérvese el patrón mesangiocapilar de la  
tinción fluorescente.

Figura 16

a)



b)



Test de afinidad por el CS. Secciones incubadas con  
CS "in vitro".

I.F. anti CS FITC

a) biopsia L.L.D.

b) biopsia J.G.C.

Observese el patrón capilar de la fluorescencia.

- TABLA 5 -

<u>Sección</u>	<u>Cantidad de CS añadida</u>	<u>Resultado</u>
a	50 nanogramos	+++
b	25 " " "	+++
c	12,5 " "	+++
d	6,2 " "	++
e	3,1 " "	+
f	1,5 " "	-

Cantidades de CS añadido "in vitro" a -  
las secciones en los tests de afinidad.

- TABLA 6 -

<u>Enfermo</u>	<u>0 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>20 min.</u>	<u>30 min.</u>
L.L.D.	0	0	++	+++
P.M.G.	0	0	++	+++
J.G.C.	0	0	++	+++
A.M.S.	0	0	++	+++

Unión del CS añ añadir guanidina 5 M a las seccio  
nes, a diferentes intervalos durante el periodo -  
de incubación.

Figura 17



Test de afinidad por el CS  
I.F. con anti CS  
biopsia L.L.D previamente tratada con  
guanidina 5 M.

C I R R O T I C O S \*

<u>Paciente</u>	<u>P/M (%)</u>	<u>P/T (%)</u>	<u>IgA total (mg%ml)</u>
1.- J.B.Z.	19,56	16,36	400
2.- L.A.	32,58	24,57	960
3.- J.A.Z.	10,50	9,09	592
4.-A.M.C.	61,54	38,09	608
5.- S.F.	18,92	15,91	780
6.- J.A.	75,97	43,17	466
7.- P.A.	55,04	35,50	160
8.- P.C.	55,64	35,75	760
9.- S.Z.	16,27	13,99	216
10.- I.Q.	49,48	33,10	No investigada

\* El diagnóstico fué confirmado en todos los casos -- por histología.

S H N \*\*

<u>Muestra</u>	<u>P/M (%)</u>	<u>P/T (%)</u>
1 .-	7,82	7,25
2 .-	11,71	10,48
3.-	10,35	9,38
4 .-	13,34	11,77
5 .-	12,64	11,22

\*\* Cada muestra procedente de un "pool" de 10 sueros normales.

Pag. 72

D I S C U S I O N



Las diferentes partes del trabajo, se discutirán separadamente, en el mismo orden en que fueron -- presentados los objetivos, métodos y resultados experimentales.

#### PARTE I:

La existencia de IgA pol ha sido demostrada en el suero de numerosas especies animales (VAERMAN J.P. 1970), constituyendo en algunas la mayor parte del total de la IgA sérica. En el hombre, en cambio, sólo = una pequeña parte de la IgA del suero, tiene un peso molecular compatible con la existencia de esta clase de polímeros. La proporción de esta IgA "pesada" de tamaño mayor de 7,5 S ha sido estimada por VAERMAN --- (1970 b) en unos 263 mg por litro de suero; (aproximadamente un 10% de la IgA total en el suero normal).

Sin embargo, la existencia de verdaderos polímeros de IgA en el suero humano normal, fué cuestionada recientemente por RADL (1975). Estos autores no pudieron demostrar en la IgA del suero las propiedades que caracterizan a la IgA pol v.gr.: afinidad por el CS, presencia de cadena J, y reactividad específica -- con antisueros dirigidos contra determinantes antigénicos propios de la IgA pol. Estos criterios son necesarios para afirmar el carácter polimérico, al no ser suficiente el criterio de un peso molecular elevado. Por todo esto, los autores concluían que nada o sólo una mínima parte (menos del 1%) del total de la IgA del suero es verdadera IgA pol, y que la fracción de

IgA "pesada" presente en el suero debería corresponder a complejos inmunes o no inmunes de IgA con otras moléculas, o a proteínas agregadas "in vivo" o "in vitro".

Nosotros hemos reinvestigado este problema de considerable interés teórico y práctico por las posibles relaciones entre la IgA pol del suero y el sistema inmunosecretor; y a diferencia de los resultados anteriormente citados, hemos podido observar la presencia de verdadera IgA pol en el suero humano normal en cantidad suficiente, como para su detección por técnicas inmunoquímicas convencionales. La proporción de IgA "pesada" purificada del suero por filtración en geles de acrilamida agarosa, representa alrededor del 10% del total de la IgA sérica, y en ella se puso de manifiesto la presencia de cadena J y la capacidad de combinación con el CS "in vitro".

Sin embargo, que proporción de moléculas de IgA "pesada" poseen realmente estas características, no puede ser establecida fácilmente con nuestros datos; no obstante, los resultados del experimento en el que las proporciones de CS I<sup>125</sup> libre y ligado a la IgA fueron separadas por ultracentrifugación tras su incubación en condiciones estequiométricas, sugieren que la mayor parte si no el total de las moléculas de IgA "pesada" se habían combinado con el CS y tenían por lo tanto el carácter de polímeros de IgA.

Las discrepancias entre nuestros resultados y los de RADL (1975), podrían deberse principalmente a diferencias metodológicas. Nosotros hemos partido de

volúmenes de suero considerablemente mayores que los citados autores, y hemos utilizado una metodología - más sensible para la caracterización de la IgA pol - que la electroforesis analítica, y la I.E.F. aplicada por ellos para la demostración de la cadena J, y la afinidad por el CS.

-----

PARTE II:

En esta sección discutiremos los resultados - publicados en la literatura, y nuestros resultados - experimentales en relación con las siguientes propie- dades de las inmunoglobulinas poliméricas:

- a) la cadena J.
- b) la afinidad por el CS.
- c) la formación de complejos no inmunes con -- otras proteínas.

a) La cadena J constituye un marcador de las - inmunoglobulinas poliméricas. Todas las moléculas Ig que son secretadas en forma de polímeros de dos o más subunidades 7S, contienen una proporción mayor o menor de cadena J. Hay sin embargo algunos aspectos refe-- rentes a esta propiedad que siguen siendo objeto de controversias entre los diferentes autores, entre -- los cuales cabe citar los siguientes: enlaces impli-- cados en la unión a los polímeros, estequiometría de dicha unión, y posible función biológica de la cade-- na J. Los datos principales alrededor de estos puntos

que han sido publicados en la literatura están resumidos en la siguiente tabla:

---

Igs Poliméricas y Cadena J

---

Tipo de Enlaces

- Principalmente covalentes.
- Débiles fuerzas no covalentes.

Estequiometria

<u>J/IgA</u>	<u>J/IgM</u>	
1	1	KOSHLAND, (1975)
0,1-1	1	LAURELL, (1976)
2	3-4	BRANDTZAEG, (1976)

Funciones Propuestas

- Indispensable para la polimerización
  - Control del tamaño de los polímeros.
  - Estabilización.
  - Unión con el CS.
- 

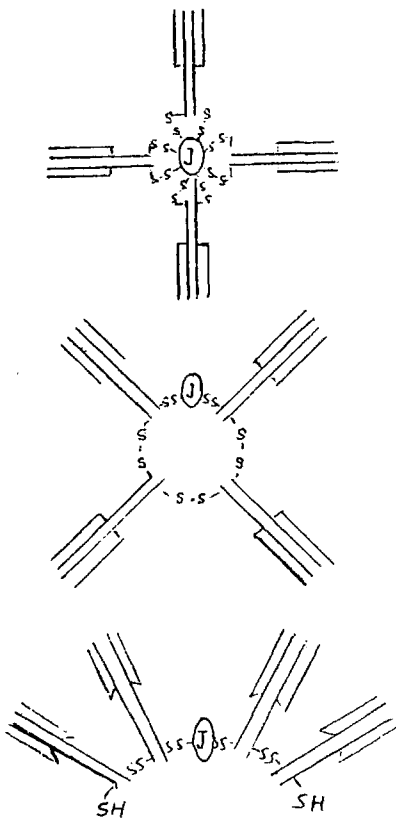
El carácter covalente de la unión de la cadena J a las Igs poliméricas, ha sido demostrado por diferentes investigadores (KOWNATZKI 1973 a, MESTECKY --- 1972, KOBAYASHI 1973), que consiguieron separar la cadena J de los polímeros por simple reducción y alqui-lación. BRANDTZAEG (1976) ha demostrado que ambas molé

culas pueden ser separadas por simple reducción sin - necesidad de alquilación; en la mayoría de los estu-- dios se suelen emplear condiciones suaves de desnaturización tales como tratamiento con guanidina 5 M - con el fin de romper uniones no covalentes. Sin embargo, los datos citados indican que las fuerzas no covalentes que unen la cadena J a los polímeros deben ser muy débiles, o ser afectadas de alguna manera por el reductor.

Un aspecto todavía no resuelto, es la estequiometría de la incorporación de moléculas de cadena J - a los diferentes tipos de polímeros. Un grupo de investigadores (INMAN, 1974, KOSHLAND, 1975), sostienen la hipótesis de que independientemente de la naturaleza y tamaño de los polímeros, la relación molar polímero a cadena J es igual a 1. En la misma línea, experimentos publicados por HAUPTMAN (1975), y TOMASI (1974), sugieren que una sola molécula de cadena J se une a - través de puente disulfuro a dos de las subunidades - que forman los polímeros incorporándose seguidamente - el resto de las subunidades al complejo cadena J-dímero a través de intercambios disulfuro en las cadenas pesadas de las subunidades. Los mismos autores han -- propuesto una disposición lineal de los polímeros de IgA, a diferencia de la típica estructura circular de las moléculas de IgM (Fig. 18).

Otros autores han publicado más recientemente resultados que están en contradicción con el modelo de una cadena J por polímero de Ig. De acuerdo con ellos existe una considerable heterogeneidad en el contenido

Figura 18



Modelos hipotéticos de ensamblaje de un tetramero de IgA. (HAUPTMAN 1975)

en cadena J de los diferentes polímeros dependiente - de la naturaleza de sus subunidades.

LAURELL (1976), ha analizado la estequiometría de la formación de complejos de cadena J con IgA pol, poli y monoclonal. El análisis comparativo de las relaciones molares entre la cadena J y diferentes paraproteínas IgA mostró unos valores distintos predominando dos grupos: uno con una relación J/IgA de alrededor de uno y otro con una relación aproximada a 0.1. Un interesante dato observado en este estudio es que existe en las paraproteínas IgA una relación inversa entre el contenido en cadena J y la tendencia de los polímeros a formar complejos no inmunes con moléculas como la alfa 1 antitripsina. Aquellas paraproteínas con una elevada relación molar J/IgA ( $\approx 1$ ) no forman complejos con la alfa 1 antitripsina, mientras que -- por el contrario las que tienen una relación de alrededor de 0,1. forman complejos de esta naturaleza. En cuanto a la IgA policlonal presente en los sueros normales, las relaciones molares son considerablemente homogéneas al comparar diferentes muestras. Sin embargo, en algunas existían considerables variaciones hacia arriba o hacia abajo, que al igual que en caso de las paraproteínas estudiadas parece estar en relación con el mayor o menor contenido en complejos con otras moléculas del suero.

Sus observaciones pueden resumirse en el siguiente concepto. La IgA se secreta al espacio extracelular como un monómero o como complejos IgA cadena J. Estos últimos tienen grupos tioles con una menor - tendencia a reaccionar con grupos tioles de las proteínas plasmáticas. Las moléculas que tienen grupos - tioles activos forman después de su secreción puentes

disulfuro con cisteína, fenilalanina y un cierto número de proteínas del plasma tales como la albúmina, prealbúmina o alfa A-T.

BRANDTZAEG (1976), ha realizado estudios - cuantitativos de la liberación de cadena J tras - la reducción de polímeros de IgA e IgM. Sus resultados ofrecen una relación molar de dos cadenas J por dímero o trímero de IgA, y tres o cuatro por pentámero de IgM. Estudios de otros laboratorios han indicado también que en el caso de la IgM humana hay más de una cadena J por pentámero, y que - la relación molar en el caso de la IgM bovina es de 2,2 (KOMAR, 1975).

De todos los datos arriba citados, se desprende que la cantidad de cadena J en las inmunoglobulinas poliméricas es un aspecto controvertible, que todavía aguarda conclusiones definitivas. Las diferencias observadas al revisar la literatura podrían ser debidas a: 1º) diferencias en la metodología empleada para la cuantificación: inmunodifusión radial (Brandtzaeg), electroinmunodifusión cuantitativa (Laurell). 2º) Inadecuada calidad de los "standars" utilizados en inmunodifusión. 3º) Impurezas que puedan contaminar preparaciones examinadas por espectrofotometría.

Nosotros nos hemos acercado a este problema, intentando determinar la cantidad de cadena J



que estaba presente en nuestras preparaciones de IgA pol (pag. 45). La estimación directa no fué posible, al carecer de una adecuada preparación de cadena J; pero pudimos comparar las cantidades liberadas por la IgA pol del suero normal, y una paraproteína IgM, tras reducción y alquilación completa. Los resultados sugerían un contenido heterogéneo de cadena J en las diferentes moléculas de la preparación de IgA pol, y la conclusión -- más aparente de estos experimentos fué que las moléculas de IgA pol poseen mayor cantidad de cadena J que las moléculas de IgM; sin embargo debido a la falta de unos adecuados "standars" y a la diferente intensidad de los anillos de precipitación (mayor en los observados en la IgM), -- no podemos ofrecer resultados más cuantitativos.

La significación biológica de la cadena J es otro aspecto no definitivamente resuelto. Inicialmente se la atribuyó un papel decisivo en la polimerización de la IgA secretoria (HALPERN --- 1970), y en otras Igs poliméricas (MESTECKY, -- 1974, WILDE 1972). El mecanismo de polimerización de la IgA e IgM ha sido estudiado "in vitro" por DELLA CORTE y PARKHOUSE (1973). Ellos incubaron células de plasmocitomas murinos productoras de paraproteínas IgM e IgA con precursores isotópicos y analizaron las Igs secretadas y sus subunidades por ultracentrifugación. Las Igs sintetizadas fueron reducidas a sus subunidades. En presencia de cadena J y de un enzima intercambiador de enlaces disulfuro, todas las subunidades se -

reensamblaban para constituir los polímeros originales. En ausencia de cadena J no se reconstruían los polímeros por lo que los autores concluyeron que la cadena J es un requisito indispensable para la polimerización. En otro estudio (1973 b) estos autores asignan a la cadena J una función controladora del proceso de polimerización de las Igs. La cantidad de cadena J intracelular sería un factor crítico que condicionaría la naturaleza y la cantidad de los polímeros secretados por las células. En el caso de las células productoras de IgM existe una síntesis balanceada que explica que todas las moléculas se secreten en forma de polímeros IgM, mientras que en las productoras de IgA, hay una producción limitada de cadena J intracelular que explica la heterogeneidad de los productos secretados que incluye una proporción mayor o menor de IgA monomérica.

Sin embargo, hay algunas observaciones -- que sugieren que la cadena J no es imprescindible para la polimerización. KOWNATZKI (1973 a) -- ha demostrado la reasociación "in vitro" de subunidades IgM en ausencia total de cadena J. Muchas de las moléculas reasociadas estaban constituidas por 6 o más subunidades, mientras que las moléculas reasociadas en presencia de cadena J -- eran preparaciones homogéneas de pentámeros 19 S lo que sugiere que si bien no es indispensable -- para la polimerización ejerce un control sobre -- el tamaño de los polímeros. El mismo autor ha investigado la influencia de la cadena J en las actividades biológicas de los polímeros. Estudiando una paraproteína IgM humana con actividad an-

ticuerpo crioaglutinina anti Pr-2 demostró que la presencia de cadena J no es necesaria para la --- unión con el antígeno ni para la capacidad de fijación de complemento; (KOWNATZKI 1973 b). Resultados de otros laboratorios parecen confirmar que la cadena J no es imprescindible para la polimerización intra o extracelular. (ESKELAND 1974 a). El mismo autor observó la incapacidad de una IgM polimérica que carecía de cadena J de combinarse -- con el CS in vivo. (ESKELAND 1974 b), lo que constituye un argumento a favor de la hipótesis de -- que la cadena J constituye el receptor específico de las Igs poliméricas para el CS BRANDTZAEG, --- (1975 a, 1976 a, 1976 b).

De los estudios de estos autores deriva un firme apoyo experimental a favor de que la cadena J es necesaria para la unión a los polímeros del CS; Sin embargo poco se sabe acerca del mecanismo íntimo de asociación. La cadena J libre apenas tiene efecto bloqueante sobre la incorporación del - CS a los polímeros. (BRANDTZAEG 1975 a) y no existen pruebas a favor de una afinidad sustancial en tre la cadena J y el CS. Una posibilidad es que - la cadena J al combinarse con las cadenas alfa o mu adquiere una especial configuración, (quizá en forma de dímero como sugiere BRANDTZAEG 1976 a), que sea imprescindible para la unión del CS.

Pero esta atractiva hipótesis funcional de la cadena J no es todavía universalmente aceptada.

Un obstáculo para su aceptación general ha sido el hallazgo de dos paraproteínas humanas en forma de polímeros de IgA que carecían de la cadena J pero mostraban una considerable afinidad - "in vitro" por el CS. TOMASI (1976).

Un dato interesante es que las dos paraproteínas que carecían de cadena J formaban complejos con la albúmina o la alfa 1-A-T. Las relaciones entre el contenido en cadena J y la --tendencia de los polímeros de IgA a formar complejos no inmunes con otras proteínas del suero, ya han sido comentadas al referirnos a la estequiometría de la cadena J y serán analizadas más extensamente en una sección posterior.

b) La afinidad por el CS.

Las inmunoglobulinas poliméricas son capaces de combinarse con CS "in vivo" e "in vitro" en una reacción cuyo mecanismo extensión y afinidad depende principalmente de la naturaleza del polímero.

En la revisión de TOMASI y BIENENSTOCK - (1968) se señala que después de añadir CS  $I^{125}$  al suero o a preparaciones de inmunoglobulinas, encontraban CS unido a la IgA. En este estudio, no se intentó diferenciar la IgA mon o pol, ni se realizaron determinaciones cuantitativas. La

primera demostración de que ésta propiedad está limitada a la IgA polimérica fué obtenida por -- MACH (1970) al demostrar la asociación "in vitro" de CS libre marcado con  $I^{125}$  de origen humano y bovino con proteínas IgA de mielomas (polímeros) y con la IgA del suero de numerosas especies animales: en la misma publicación se señala la incorporación del CS a la IgM del suero de alguna de las especies estudiadas. Poco después RADL -- (1971) demostró la incorporación del CS a moléculas IgA e IgM humanas pero sus resultados sugerían que el CS se combinaba con moléculas IgM de tamaño mayor de 19 S en tanto que las moléculas de tamaño convencional no mostraban una afinidad sustancial por el CS. Otros investigadores BRANDT ZAEG (1974), LINDH (1974), no han confirmado esta última observación, y han demostrado la unión del CS "in vitro" a la IgM 19 S.

En los últimos años se ha propuesto que esta propiedad de las Igs poliméricas depende de la presencia de la cadena J en los polímeros (ESKELAND 1974, BRANDTZAEG 1975), como hemos discutido en el apartado anterior. El mecanismo de asociación, ha sido estudiado en detalle por varios grupos de investigadores, y las principales conclusiones aportadas están recogidas en la siguiente tabla:

---

Igs Poliméricas y CS

---

Tipo de Enlaces

- Principalmente no covalentes
- Estabilización covalente de IgA CS

Estequiometria

<u>CS/IgA</u>	<u>CS/IgM</u>	
1/1	1/1	Weiker (1975)
1/1	0,8/1-2/1	Lindh (1974)
1/1,5-1/2,5	1/1,5-1/2,5	Brandtzaeg (1977)

Afinidad

- Relación de afinidades por el CS  
IgM > IgA

Funciones del CS

- Transporte a las secreciones
  - Resistencia a la proteolisis.
-

Los enlaces químicos implicados en la interacción del CS con las Igs poliméricas son heterogéneos según la naturaleza del polímero y la especie animal. En el hombre las interacciones entre el CS y la IgA S, son principalmente no covalentes pero estas fuerzas son reforzadas y estabilizadas por enlaces disulfuro, los cuales aparentemente existen en solo un 75% de las moléculas asociadas (TOMASI 1968, NEWCOMB 1968, BRANDTZAEG 1971, MESTEDKEY 1972). El CS en las moléculas de IgA S no reacciona con anticuerpos preparados frente a --- ciertos determinantes antigénicos presentes en el CS libre (determinantes I) lo que sugiere que --- existen fuertes interacciones no covalentes entre la IgA y el CS en las moléculas de IgA S (BRANDTZAEG 1968), . En la IgA secretoria del conejo el CS está unido exclusivamente por enlaces no covalentes (CEBRA 1967, HALPERN 1970).

En cuanto a las interacciones del CS con las Igs poliméricas del suero humano, la IgA se combina inicialmente por fuerzas no covalentes estabilizándose la unión por enlaces disulfuro. La formación de estos enlaces ha sido estudiada por LINDH (1975), en complejos IgA-CS. Un pequeño número de grupos tioles (alrededor de 0,4 grupos -- por mol de proteínas) están presentes en las cadenas pesadas y ligeras de la IgA dimérica, pero no son detectados ni en la cadena J ni en el CS. Los grupos SH de la IgA son probablemente el resultado de la oxidación incompleta de algún puente disulfuro intra o intercatenario. El puente S-S entre el CS y la IgA se forma seguramente después -

de la asociación de las dos proteínas por una -- reacción de intercambio disulfuro-sulfidrilo en la que la pequeña cantidad de grupos sulfidrilos sobre el dímero de IgA inicia la reacción reduciendo un puente S-S lábil sobre la molécula del CS (CUNNINGHAM - RANGLES 1975). Esta reacción de intercambio, necesita probablemente ciertos requisitos conformacionales de una o ambas proteínas y conduce a la formación de nuevos enlaces S-S entre ellas. La reacción no es completa ya que lo mismo que en el caso de la IgA secretoria, no todos los polímeros de IgA se unen por enlaces covalentes y un cierto porcentaje de moléculas se disocian en condiciones denaturantes; en el caso de la IgA secretoria, no todos los polímeros de IgA se unen por enlaces covalentes y un cierto porcentaje de moléculas se disocian en condiciones denaturantes; en la publicación de MACH(1970), se demuestra que un 20% de los complejos IgA-CS formados "in vitro" se disocian con guanidina 6 M permaneciendo el resto unidos por puentes S-S. En un detallado estudio WEICKER (1975), demostró que los complejos formados con IgA son sólo parcialmente disociados con guanidina, mientras que en iguales condiciones, todo el CS se libera de los complejos formados con IgM. Una de las proteínas incluidas en su estudio, -- era un trímero IgA<sub>2</sub> (Am 2+) formaba complejos -- con el CS exclusivamente por fuerzas no covalentes a diferencia del resto de las paraproteínas estudiadas que eran dímeros de IgA<sub>1</sub>; hasta el momento no se sabe si la formación de enlaces di--



sulfuro se asocia preferentemente a alguna sub--clase particular, o a determinadas formas polimé--ricas de IgA. UNDERDOWN (1977) ha demostrado re--cientemente que los enlaces covalentes que se -establecen en los complejos de IgA y CS, el CS -se une por enlaces disulfuro a una sola de las -subunidades monoméricas que constituyen el polí--mero tanto en la IgA del suero como en la IgA S. Estudios de otros investigadores han confirmado el carácter no covalente de las fuerzas que in--tervienen en la unión del CS a la IgM. (BRANDT--ZAEG 1976, LINDH 1975). En estos complejos el nú--mero de estas fuerzas parece ser muy superior al que interviene en la formación de complejos con IgA polimérica (ver más adelante). La falta de enlaces covalentes en los complejos IgM-CS, es -el fundamento de una técnica de aislamiento de -CS libre (UNDERDOWN 1977). La técnica se basa en la unión no covalente del CS libre a IgM insolubilizada. Los complejos formados sobre el inmuno--sorbente, se disocian con una solución denaturan--te obteniéndose preparaciones de CS libre de con--siderable pureza con un rendimiento muy superior al obtenido con otras técnicas establecidas, basa--das en cromatografías sucesivas en sephadex y --DEAE celulosa.

La cinética de la formación de enlaces di--sulfuro en complejos formados por paraproteínas IgA e IgM con CS ha sido objeto de una reciente publicación (LINDH 1977). En ella se presentan -datos cuantitativos sobre las proporciones rela--tivas de CS libre ligado a un dímero de IgA por enlaces covalentes y no covalentes. Una rápida -cinética en la formación de estos enlaces fué ob--

servada cuando los reactivos se incubaban a diferentes temperaturas; sin embargo la cinética de la formación de enlaces disulfuro variaba mucho dependiendo de la temperatura de incubación; la reacción ocurría de un modo extremadamente lento a 4° y la velocidad aumentaba progresivamente al incrementar la temperatura alcanzando el máximo alrededor de 37°. Por el contrario la cinética de formación de enlaces no covalentes fué extremadamente rápida e independiente de la temperatura de incubación. Sus resultados con-firman la hipótesis de que estas fuerzas son -- los enlaces primarios que se formaban al comienzo de la reacción y que estas interacciones inician un intercambio de enlaces disulfuro que -- conducen a la estabilización del complejo por - fuerzas covalentes.

Nuestros experimentos realizados con IgA pol de suero normal, se realizaron a temperatura ambiente; y en estas condiciones nosotros encontramos una rápida cinética de la formación - de puentes disulfuro lo cual no está de acuerdo con la observada por LINDH, en una IgA monoclonal dimérica. Ya que las condiciones experimentales fueron muy similares en ambos estudios, nosotros creemos que las diferencias pueden ser - el reflejo de la heterogeneidad de las moléculas de IgA presentes en el suero normal, que impide la comparación con resultados obtenidos con una preparación homogénea de IgA monoclonal.

Análisis de los factores implicados en la asociación "in vitro" del CS a las Igs poliméricas.

Desde la primera publicación de MACH ---- (1970), demostrando la unión "in vitro" del CS a la IgA pol la mayoría de los autores han reproducido sus condiciones experimentales (incubación de una hora a 37° en PBS), pero existen algunas publicaciones que analizan la influencia de diferentes factores (tiempo de incubación, temperatura, fuerza iónica ect) sobre el proceso de asociación. En el estudio de WEICKER (1975) se demuestra que la unión del CS a la IgM es compatible con un amplio margen de temperaturas (entre 4 y 30°); por encima de los 30° ocurre un progresivo descenso de la capacidad de asociación "in vitro". El pH óptimo para la unión de ambas moléculas está alrededor de 7 pero hay una asociación parcial con valores comprendidos entre 5 y 9. En cuanto al tiempo de asociación, la reacción se completa a las 2 h. de incubación alcanzando el 80% al final de la primera hora. De estos resultados se puede concluir que la asociación del CS a la IgM es una reacción relativamente rápida y poco exigente respecto a las condiciones experimentales.

BRANDTZAEG (1975), ha estudiado el efecto de la concentración de sales en el medio de incubación sobre la combinación del CS con IgM monoclonal, e IgA dimerica policlonal. Los polímeros fueron incubados con CS marcado con  $I^{125}$  en dife

rentes concentraciones de ClNa a pH 8, y el porcentaje del CS unido, estimado por centrifugación en gradientes de sacarosa preparados en los mismos medios usados en la incubación. Los resultados mostraron un efecto variable de la concentración de sales según la naturaleza del polímero. La asociación con moléculas de IgM ocurre incluso a concentraciones de ClNa relativamente elevadas (hasta 1M), mientras que la asociación con IgA es prácticamente inhibida al elevar la fuerza iónica por encima de 0,5 M. Estos resultados demuestran que las fuerzas no covalentes son de gran importancia durante las interacciones iniciales Ig-CS, y que hay claras diferencias en la intensidad de estas fuerzas entre los polímeros IgM e IgA.

Afinidad y estequiometría de la unión del CS a los polímeros IgA e IgM.

Estos aspectos han ofrecido resultados aparentemente contradictorios al ser estudiados por diferentes grupos de investigadores (ver tabla pag. 85). Los estudios de WEICKER (1975) sugieren que los pentámeros de IgM y los dímeros de IgA se combinan con el CS con aproximadamente la misma afinidad existiendo en ambas clases de Ig un sitio combinante para el CS por polímero. El valor de las constantes de asociación fueron de  $10^8 \text{ M}^{-1}$  semejante a la que se encuentra en algunas reacciones Ag-Ac pero diferente de éstas en que la velocidad de disociación es mucho más lenta. LINDH (1974), ha analizado la estequiometría de los complejos IgA CS por tres técnicas diferentes; las tres pusieron de manifiesto que de las cuatro paraproteínas IgA diméricas incluidas en el estudio, dos se combinaban con el CS -

en cantidades equimolares, mientras que las --  
 otras tenían una capacidad de combinación mucho  
 menor. La razón para la diferencia observada se  
 debía seguramente a que las proteínas con baja  
 capacidad de combinación tenían unidas inespecí-  
 ficamente moléculas de albúmina y alfa A-T (ver  
 sección siguiente) que seguramente bloqueaban -  
 los sitios combinantes para el CS (LINDH 1975),.  
 El mismo autor ha realizado estudios con complejos  
 de IgM-CS formados "in vitro". Los resultados -  
 con tres diferentes paraproteínas IgM, y con --  
 IgM normal variaron entre 0,8 y 2 moles de CS -  
 por mol de IgM. Estas variaciones podrían deber-  
 se a varias posibles causas; la más probable al  
 bloqueo por proteínas que forman complejos ines-  
 pecíficos ya que la paraproteína con menor capa-  
 cidad de combinación tenía asociadas cantidades  
 significativas de albúmina y alfa A-T.

Por último (BRANDTZAEG 1977), ha estudia-  
 do también estos aspectos de la interacción del  
 CS con las Igs poliméricas; sus resultados su-  
 gieren que no hay más de un sitio combinante pa-  
 ra el CS de afinidad elevada y capacidad limita-  
 da por polímeros, siendo las relaciones molares  
 CS/Ig polimérica de 0,6-0,7; las fuerzas no co-  
 valentes, que intervienen en la formación de --  
 los complejos son muy superiores para la IgM, -  
 así como la constante de asociación (2,7 a 12,5  
 veces superior a la determinada en los comple-  
 jos de IgA-CS). Consecuentemente las afinidades

relativas por el CS dan valores de 5 a 30 veces superiores para la IgM que para la IgA dependiendo de las preparaciones comparadas. La mayor -- afinidad de la IgM para el CS podría ser el reflejo de un mayor contenido en cadena J, ya que la configuración del sitio combinante para el CS parece estar determinada por la cadena J asociada a los polímeros.

En ningún trabajo de la extensa literatura revisada sobre el tema ni en la presente investigación, se ha podido demostrar la combinación del CS "in vitro" con proteínas IgG, IgD, IgE, o monómeros de IgA e IgM, por lo que es -- evidente que se trata de una característica de las Igs poliméricas. Los resultados de JERRY (-1972) que sugieren la combinación del CS con monómeros de la subclase IgA2 (Am2+), no invalidan esta definitiva afirmación ya que en este caso, se requieren concentraciones muy altas de CS, - y la reacción es de una afinidad mucho menor.

#### Funciones del CS:

En las primeras publicaciones acerca del CS se le denominaba pieza de transporte, un nombre basado en la hipótesis de que podría intervenir en el transporte de la IgA e IgM a través de las células epiteliales (SOTH 1966). Esta hipótesis estaba basada en la observación de que tras una transfusión masiva en enfermos agammaglobulinémicos se observa la aparición selecti-

va de IgA unida al CS en la saliva. A favor de esta función de transporte está el hecho de que las células epiteliales alineadas en las superficies mucosas sintetizan CS al cual va a combinarse la IgA secretoria. BRANDTZAEG (1974) ha sugerido que el CS podría ser un receptor de las membranas celulares -- para las inmunoglobulinas poliméricas (posiblemente para la cadena J); su hipótesis se basa en resultados de inmunofluorescencia de las mucosas que demuestran la presencia de IgA e IgM asociada al CS.

Otra posible función de CS fué propuesta por TOMASI (1968) quien sugirió que el CS podría proteger a la IgA de la degradación proteolítica en las secreciones. Algunas pruebas experimentales en favor de este papel del CS derivan de experimentos en que cantidades progresivas de CS fueron extraídas de la IgA S de conejo (STEWART 1970); o humana (GHETIE 1973) y el grado de proteólisis estudiado en función del contenido en CS. En ambos casos se observó un descenso progresivo de la resistencia a la proteólisis al extraer el CS; sin embargo no puede descartarse que en estos experimentos se hubiera producido algún daño en la porción IgA de la molécula de IgA S que aumentara su susceptibilidad a la degradación proteolítica.

Resultados más concluyentes fueron obtenidos por LINDH (1975). Este autor demostró que complejos formados "in vitro" de CS e IgA dimérica, son indistinguibles de las moléculas de IgA secretoria que se observan en las secreciones externas y utilizó -

estos complejos para investigar la acción protectora del CS, comparando la resistencia a la proteólisis de la IgA dimérica antes y después de combinarse con el CS. Los resultados demostraron que el CS estabiliza a la IgA haciéndola más resistente a la proteólisis y confiriendo al dímero un grado de resistencia a la papaína y la pepsina idéntica al de la IgA S.

c) Una característica de las proteínas IgA, es su tendencia a formar complejos no inmunes con otras proteínas del suero "in vivo o in vitro". - (HEREMANS 1960). Esta propiedad no es exclusiva de la IgA sino que en alguna extensión también se presenta en moléculas IgM (HEREMANS 1961). En este apartado discutiremos algunos aspectos de este fenómeno que están resumidos en la siguiente tabla:

---

COMPLEJOS CON OTRAS PROTEINAS

---

	<u>Albúmina</u>
	<u>Alfa A- T.</u>
PROTEINAS ASOCIADAS	Lipoproteínas
	Haptoglobina
TIPO DE ENLACES:	Covalente S-S
	Naturaleza del polímero
FACTORES IMPLICADOS:	Concentración
	Cantidad de Cadena J
HIPOTESIS:	La formación de estos complejos compete con la unión al polímero del C.S.

---



Un amplio número de proteínas del suero -- pueden combinarse con la IgA y la IgM para formar este tipo de complejos. El único requisito aparentemente necesario es que contengan grupos tioles reactivos con grupos SH libres de las cadenas alfa o mu. Los ejemplos mejor estudiados son la albúmina y la alfa A-T que se combinan con un elevado porcentaje de paraproteínas IgA e IgM, y con una cierta proporción de la IgA del suero normal. Otras proteínas que se han observado formando complejos de este tipo son la haptoglobina, alfa glicoproteína, algunas beta lipoproteínas y factores antihemofílicos. GLUEK (1965) ha descrito complejos de IgA monoclonal con globulina antihemofílica en un enfermo con trastornos de la coagulación. De todas las proteínas citadas solamente la albúmina y la alfa A-T forman complejos de manera regular.

En un detallado estudio MANNIK (1967) demostró que la albúmina se une a proteínas IgA e IgM -- por medio de puentes disulfuro. El sitio de unión está localizado en las cadenas H afectando a un -- grupo SH libre de las cadenas alfa (ROSENSTEIN --- 1972). El fenómeno ha sido estudiado en detalle -- por TOMASI (1974 a) (1974 b). En experimentos con paraproteínas IgA purificadas, observó la aparición de dos bandas de migración rápida en electroforesis de poliacrilamida después de la reducción con dos mercaptoetilamina 0.02M, que por inmunodifusión de mostró que se trataba de albúmina y alfa A-T. Ambas moléculas estaban covalentemente unidas a la IgA -

ya que no se liberaban por electroforesis en urea 10M. Las bandas de proteínas eran muy débiles o inaparentes tras la reducción con ditioeritritol (DTT) 0.01M debido a que la reducción en estas condiciones provocaba la agregación de las moléculas de albúmina y alfa A-T impidiendo su migración en los geles. La posición de las moléculas liberadas se situaba en la zona de migración de la cadena J por lo que es muy posible que estas proteínas sean responsables de las bandas que acompañan con frecuencia a la cadena J en las electroforesis de Igs poliméricas previamente reducidas. Las ocho paraproteínas IgA incluídas en el estudio formaban complejos con la albúmina y la alfa A-T. Por inmunoelectroforesis con antisueros contra estas proteínas, se observó que de un total de 49 sueros con paraproteínas IgA un 73% tenían complejos IgA alfa A-T, y un 65% IgA albúmina. La mayoría de estos sueros positivos tenían ambos tipos de complejos; pero en la inmunoelectroforesis frente a una mezcla de anticuerpos anti albúmina y anti alfa A-T los arcos correspondientes a los complejos de albúmina y alfa A-T se cruzaban poniendo de manifiesto que en cada suero estas proteínas estaban unidas a diferentes moléculas IgA.

Una cuestión interesante todavía no definitivamente aclarada es: ¿Que variedad de moléculas IgA posee esta propiedad?. La opinión probablemente mayoritaria es que se trata de una propiedad de la IgA polimérica. En el estudio citado TOMASI

(1974 a) sugiere que los complejos se constituyen con IgA en forma dimérica, mientras que no se forman con polímeros mayores ni con la IgA monomérica. Sus resultados son consistentes con la hipótesis de que una sola molécula de albúmina o de alfa A-T se unen a un dímero de IgA. Algunos resultados de otros investigadores parecen estar en desacuerdo con los que acabamos de citar. LAURELL - (1976) ha publicado estudios cuantitativos sobre los complejos de alfa A-T con IgA del suero poli y monoclonal. Sus conclusiones pueden resumirse - como sigue: Alrededor del 4% del total de la IgA del suero normal forma complejos con la alfa A-T. La cantidad de complejos IgA alfa A-T en el suero guarda una mayor correlación con la cantidad de - IgA que con la cantidad de alfa A-T lo cual indica que la cantidad de IgA secretada por las células plasmáticas tiene más importancia para la -- formación de los complejos, que la cantidad de alfa A-T extracelular.

En los sueros con paraproteínas IgA, se encontraron cantidades relativamente bajas de complejos de alfa A-T, y existía una clara correlación entre la cantidad de complejos y el contenido en cadena J; las paraproteínas IgA con una relación molar J/IgA próxima a 1 tenían cantidades de complejos muy inferiores a aquellas con relaciones - molares J/IgA bajas (0,2 o inferior). Esta relación inversa entre formación de complejos y contenido en cadena J sugiere que los grupos tioles de

moléculas de IgA con cadena J tienen una menor -  
tendencia a intercambiarse con la alfa A-T, que  
los grupos tioles de la IgA sin cadena J.

Como describimos en el capítulo de resul-  
tados, nosotros hemos detectado por precipita-  
ción, la presencia de albúmina y alfa A-T forman-  
do complejos con todas las preparaciones de IgA  
pol, mientras que en ningún caso hemos encontra-  
do este tipo de complejos con IgA mon. Por esta  
razón, creemos que esta propiedad está restringi-  
da a la fracción polimérica de la IgA del suero  
normal.

¿Cual es la significación de los comple-  
jos de IgA con otras proteínas del suero?. Como  
ha sido apuntado por TOMASI (1972) podría tener  
una significación escasa o nula, reflejando sim-  
plemente la tendencia de la IgA a asociarse con  
ella misma u otras proteínas del suero; pero po-  
dría ser que estos complejos cumplan una impor-  
tante función biológica. Es posible que la alfa  
A-T proteja a la IgA de la proteólisis, o que la  
incorporación a la IgA determine el transporte -  
de la alfa A-T a las secreciones. Experimentos -  
del propio TOMASI (1974: b ), sugieren la posibi-  
lidad de que la alfa A-T sea transportada a la --  
luz de las secreciones externas formando comple-  
jos con IgA, siendo entonces liberada.

-----

PARTE III

Recientemente se ha despertado un gran interés por el tema de la IgA por principalmente como consecuencia de los resultados obtenidos por el grupo de Vaerman: Estos investigadores han demostrado la existencia de importantes relaciones entre la IgA del suero y la IgA S, y la contribución del sistema hepatobiliar a la inmunofisiología del tubo digestivo, en experimentos realizados en roedores. La primera evidencia a favor de la contribución del sistema hepatobiliar a la IgA de las secreciones externas, fué la demostración de que la IgA S es una de las proteínas que se encuentra a mayor concentración en la bilis de la rata (LEMAITRE-COELHO 1977). Esta IgA no es sintetizada en los hepatocitos ni en el epitelio biliar por lo que con toda probabilidad procede del suero y se combina con el CS a nivel del árbol biliar posiblemente como consecuencia de su afinidad específica por esta molécula siendo secretada como IgA S. Su transporte del suero a la bilis requiere la intervención de un mecanismo activo a nivel del hepatocito, que bombee la IgA en contra de un fuerte gradiente de concentración, ya que la cantidad de IgA presente en las secreciones del tramo superior del tubo digestivo de la rata es varias veces superior a la que existe en el suero.

Los mismos autores han demostrado que por lo menos el 90% de la IgA S de la porción superior del intestino de la rata procede de la bilis. (LEMAITRE-COELHO 1978 a).

Quizá el experimento más concluyente a favor de las interrelaciones entre la IgA del suero y la IgA S, fué el análisis de los niveles séricos de IgA en el suero de ratas a las que se habrá -- realizado la ligadura del conducto colédoco, antes y después de liberar la obstrucción. (LEMAITRE -- COELHO 1978 b). La consecuencia del cierre de las vías biliares es un aumento progresivo de los niveles de IgA sérica, que llega a alcanzar niveles -- hasta 100 veces superiores a los del suero normal a los diez días de obstrucción total. Este aumento es selectivo y no se acompaña de aumentos significativos de los niveles séricos de otras proteínas. El efecto es, sin embargo, transitorio recuperándose la cifra normal de IgA sérica en pocas horas, si la obstrucción del colédoco no ha durado más de 24 horas. La IgA que se acumula en el suero a consecuencia de la obstrucción del conducto biliar en la rata es IgA S y junto con ella se observaron -- cantidades importantes de C S libre. En otro estudio, los mismos investigadores demostraron que el hígado de rata perfundido es capaz de transferir -- activamente IgA monoclonal de la circulación hacia la bilis en contra de un fuerte gradiente de concentración. (JACKSON 1978).

Resultados muy recientes obtenidos en el -- hombre (SMITH 1979) también han demostrado la presencia de IgA S en la bilis a elevada concentración, posiblemente derivada de la sangre; y se ha demostrado que existe un mecanismo de fijación de la IgA a los hepatocitos restringido a la fracción polimérica que podría explicar al menos en parte -- el aclaramiento de IgA pol del suero. (HOPF 1978).

Las variaciones observadas por nosotros en los niveles séricos de IgA pol en muestras de un suero obtenidas al momento de la máxima obstrucción biliar, y tras la remisión espontánea de la misma, apoyan el concepto de que el sistema hepatobiliar tiene una función de aclaramiento de IgA pol del suero humano. El incremento de IgA en este enfermo mayormente limitado a la fracción polimérica y su descenso selectivo al remitir el proceso obstructivo es semejante al observado por LEMAITRE COELHO en la rata tras la oclusión del conducto biliar. Sin embargo los resultados son difícilmente comparables; en primer lugar la rata carece de vesícula biliar por lo que la respuesta a la obstrucción total o parcial del colédoco puede ser de algún modo diferente de la del hombre; en segundo lugar la mayor parte de la IgA del suero de la rata es polimérica a diferencia de la IgA del suero humano; y en tercer lugar nosotros no tenemos un conocimiento seguro del grado de obstrucción biliar al tiempo de realizarse la toma de las diferentes muestras, guiándonos exclusivamente por las cifras de bilirrubina en el suero.

Un dato que vino a complicar la interpretación de los resultados fué el descenso de IgG en la segunda muestra, que nosotros pensamos que se debe simplemente a la remisión del proceso inflamatorio con la disminución consiguiente de la hiper-gammaglobulinemia.

Sobre la base de los resultados de la literatura y de nuestras propias observaciones, presentamos un modelo en buena parte especulativo acerca del papel del sistema hepato-biliar en la inmuno fisiología de la IgA (fig. 18).

Las células precursoras de las productoras de IgA S proceden principalmente de las placas de Peyer y a través de los linfáticos mesentéricos y el conducto torácico pasan a la circulación. Desde allí y por razones todavía no bien conocidas van a alojarse selectivamente a los epitelios mucosos y entran en un proceso de proliferación y diferenciación a células efectoras productoras de IgA -- pol. Probablemente la mayor parte de esta IgA pasa a la luz intestinal como IgA S tras combinarse con el C S producido por las células epiteliales, pero una parte, revierte hacia la sangre sin combinarse con el CS contribuyendo al "pool" de IgA "pol del suero. Suponemos aunque esto no ha sido demostrado, que la mayor parte si no la totalidad de la IgA pol del suero, tiene un origen local, y que su destino final es incrementar el "pool" -- de IgA S al ser filtrada por el hígado y secretada hacia la bilis unida al CS. La incorporación -- del CS a la IgA podría ocurrir a nivel del parénquima hepático o del epitelio biliar. El hígado -- jugaría un papel crucial interviniendo activamente en contra de un gradiente de concentración, y gracias a ello los niveles de IgA pol en el suero permanecen estables en valores próximos al 10% -- del total de la IgA del suero. Los elevados nive-

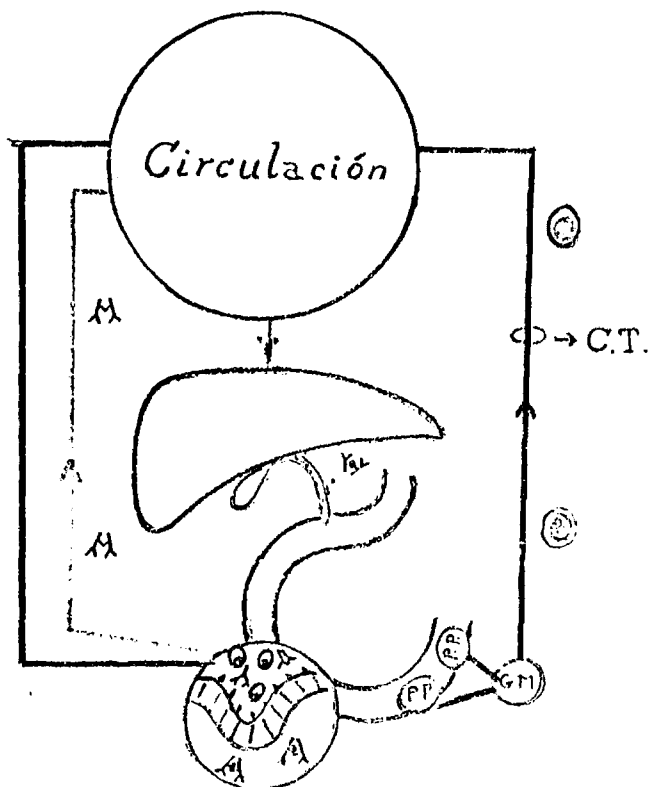


les de IgA "pesada" observados por nosotros en el suero de enfermos cirróticos podría ser el resultado del fracaso de esta función hepática.

El aclaramiento de la IgA por el suero -- puede tener importancia fisiológica no solo al incrementar las defensas locales (contribuyendo al sistema inmunosecretor), sino previniendo posibles efectos patogénicos que podría ocasionar su acumulación en determinados lugares del organismo: en este sentido la demostración de que la IgA presente en las glomerulonefritis de los cirróticos es polimérica, (última parte de este trabajo) parece de gran importancia al respecto.

-----

FIGURA 19



— Tráfico de las células productoras de IgA S.  
 . . . Vía de circulación de la IgA pol.  
 C.T. - Conducto torácico, P.P. - Placas de Peyser, G.M. -  
 ganglio mesentérico,  $\Delta$  - CS  $\gamma$  - IgA pol.  
 $\gamma_{\Delta}$  - IgA S.

#### PARTE IV

La existencia de lesiones de glomerulonefritis en autopsias de pacientes muertos por cirrosis hepática se ha observado desde hace varias décadas por diversos grupos de investigadores (BAXTER 1946) (HORN 1942) (PATEK 1951). Estas lesiones parecen ser un acontecimiento frecuente en la evolución terminal de los cirróticos ya que se encuentran al menos en un 20% de las biopsias renales de estos pacientes (BLOODWORTH 1959) (SALOMON 1965). Generalmente se descubren como una proliferación mesangial a veces asociada con afectación capilar que han sido descritas como glomeruloesclerosis del cirrótico. No existe una clara correlación entre los datos clínicos o analíticos y la existencia de lesiones glomerulares; éstas se han descrito en enfermos cirróticos sin evidencia clínica de afectación renal y por otra parte su presencia no explica de manera satisfactoria la insuficiencia renal observada en el curso clínico de otros pacientes. Tales lesiones glomerulares no son exclusivas de los cirróticos ya que lesiones similares han sido observadas en otros enfermos hepáticos e incluso en sujetos control (JONES 1961).

El estudio de las biopsias por microscopía electrónica e inmunofluorescencia (SAKAGUCHI 1965), (MANIGAND 1970) han puesto de manifiesto que las lesiones consisten de depósitos unos amorfos otros osmiofilos que contienen inmunoglobulinas y que entre éstas existe un gran predominio de moléculas -

de IgA depositadas. Esta Ig constituye un hallazgo prácticamente constante en todas las biopsias con lesiones glomerulares (CALLARD 1975),, y estos autores consideraron como características de la nefritis del cirrótico los siguientes datos: un engrosamiento de la matriz mesangial y la presencia de depósitos mesangiales y subendoteliales de IgA.

Más recientemente BERGER 1977 ha publicado estudios sobre una larga serie de 100 biopsias renales de cirróticos caracterizando las lesiones por microscopía óptica e inmunofluorescencia: En 68 casos se observaron depósitos de inmunoglobulinas -- por inmunofluorescencia con un gran predominio de IgA: En 58 casos los depósitos fueron esencialmente mesangiales con sólo algunas extensiones subendoteliales en un pequeño número de casos.

Tan sólo en cuatro casos se observaron depósitos capilares finos de inmunoglobulinas con un patrón pseudo lineal.

El análisis de esta serie ha permitido la clasificación de las lesiones glomerulares del cirrótico en dos formas distintas: (1) Formas no proliferativas: Son las más frecuentes y se caracterizan por un engrosamiento mesangial con formaciones claras redondeadas que son depósito de inmunoglobulinas en las que predomina la IgA aunque puede haber pequeñas cantidades de IgG, IgM y C<sub>3</sub>. No suelen dar manifestaciones clínicas presentando a veces -

una hematuria microscópica. (2) Formas proliferativas. Comprenden desde una proliferación mesangial moderada a una auténtica glomerulonefritis membranoproliferativa; los depósitos también están constituidos por IgA, y la evolución clínica es sumamente variable de unos casos a otros.

Como indicamos anteriormente no existe una clara relación entre los hallazgos histológicos y la presencia o ausencia de síntomas clínicos de afectación renal; y por otra parte la presencia de lesiones de glomerulonefritis con depósitos de IgA parece independiente de los signos de disfunción hepática; a veces aparecen en cirrosis con mínimas manifestaciones clínicas y biológicas, -- llegando incluso a ocasionar la muerte del enfermo por insuficiencia renal sin que se produzca -- una descompensación de su hepatopatía, mientras -- que en otros casos no aparecen en sujetos con graves signos de insuficiencia hepática.

Hay dos incógnitas importantes desde el -- punto de vista teórico, y fisiopatológico, acerca de los depósitos de IgA observada en los riñones de los enfermos cirróticos.

(a) ¿Cual es la naturaleza de esta IgA depositada en los glomérulos?. (b) ¿Hay alguna razón fisiopatológica para que aparezcan estos depósitos de IgA en los enfermos hepáticos?. En esta última parte de nuestro trabajo hemos buscado una -- respuesta a estas preguntas, y creemos haber alcanzado algunas conclusiones válidas.

La naturaleza de la IgA presente en riñones de los enfermos cirróticos es actualmente un motivo de interesantes especulaciones. Una posibilidad ampliamente aceptada es que se trate de IgA unida a algún antígeno formando inmunocomplejos (BERGER 1977) (NOCHY 1978). Hay varios datos que apoyan esta posibilidad: así en muchos de estos pacientes se han detectado crioglobulinas (DRUET 1973), la existencia de anastomosis porto cava espontáneas y "shunts" intrahepática en los cirróticos hace que una importante fracción de la sangre portal escape a la acción depuradora de las células de Kupffer lo que facilita el paso de antígenos intestinales a la circulación general y la formación de complejos antígeno anticuerpo que podrían depositarse en el riñón (TRIGER 1972). La frecuente disminución del  $C_3$  sérico y su observación ocasional en las biopsias renales es otro argumento a favor de este posible mecanismo patogénico. Sin embargo todos estos argumentos son indirectos y de carácter circunstancial no existiendo a nuestro juicio ninguna evidencia segura a favor de esta hipótesis.

La segunda alternativa no excluyente de la anterior es que los depósitos de IgA estén constituidos por IgA pol; éstas moléculas podrían ser atrapadas en las membranas basales glomerulares al sobrepasar un cierto dintel de concentración en el suero.

Nuestros resultados demuestran que al me-  
nos en algunos casos, la IgA depositada en los  
riñones cirróticos es polimérica. Este carácter  
lo hemos demostrado con una técnica sencilla ba-  
sada en la fijación del CS "in vitro" a las sec-  
ciones renales de varios pacientes cirróticos;  
los controles empleados permitieron descartar -  
la presencia de IgA S ó CS libre, ó la incorpo-  
ración "in vitro" del CS a la IgM. El método --  
tiene la ventaja de que permite observar de for-  
ma directa la formación de complejos IgA-CS sin  
necesidad de realizar técnicas de elución y ais-  
lamiento de la IgA depositada que requieren dis-  
poner de gran cantidad de tejido renal, y con-  
llevan inevitablemente el riesgo de desnaturali-  
zación a pH ácido, un rendimiento bajo, y la po-  
sible pérdida de la reactividad "in vitro" con  
el CS. Todas éstas dificultades técnicas pensa-  
mos que han conducido a los resultados discre-  
pantes publicados en la literatura.

Una cuestión importante, es si estos ha-  
llazgos son realmente representativos de la ne-  
fropatía IgA del cirrótico, o si más bien cons-  
tituyen una variedad dentro del grupo de enfer-  
mos que desarrollan nefritis caracterizada por de-  
pósitos de IgA. Es difícil responder a esta pre-  
gunta con nuestros propios resultados; un dato  
llamativo de los casos estudiados por nosotros,  
fué el intenso predominio capilar de los depósi-  
tos de IgA, lo que parece ser un hallazgo infre-  
cuente en los cirróticos (BERGER 1977); no obs-  
tante, la naturaleza polimérica no está restrin-

gida a la IgA depositada con este patrón particular, ya que muy recientemente hemos estudiado dos nuevos casos que tenían IgA de localización mesangial y que mostraron resultado positivo en el test de afinidad con el CS.

Aunque el número de casos estudiados es pequeño nos parece significativo que en la mayoría hemos podido demostrar el carácter polimérico de los depósitos de IgA. De cualquier modo la presencia de IgA pol, no excluye la posibilidad de que coexistan depósitos de IgA+antígeno en forma de inmunocomplejos; quizá esto pueda explicar el curioso cambio de patrón de inmunofluorescencia que observamos al incubar con los sueros anti IgA y anti CS.

Solamente en dos casos que tenían depósitos de IgA, el test de afinidad por el CS -- fué negativo, no evidenciándose depósitos de -- IgA pol. Un hecho significativo fué que la --- cuantificación de IgA "pesada" en el suero de estos enfermos fué inferior al 10% de la IgA - total; y esto nos lleva a la segunda cuestión que planteábamos al comienzo de esta discusión. Las cuantificaciones de IgA "pesada" en el suero de un grupo de enfermos cirróticos, puso de manifiesto proporciones de IgA pol superiores al 15% de la IgA total en el 80% de los casos; en algunos observamos proporciones de casi el 50% de la IgA total. Aunque no hemos tenido la oportunidad de biopsiar ninguno de los enfermos





en los que encontramos niveles elevados de IgA "pesada" en el suero, creemos que la presencia de IgA pol en el riñón del cirrótico puede estar relacionada con la prolongada acumulación de niveles elevados de IgA pol en el suero como consecuencia del fracaso funcional hepático en el aclaramiento de esta IgA.

Un hecho aparentemente en contra, es -- que no se ha descrito a nuestro conocimiento, -- este tipo de nefropatía en mielomas con para-- proteínas IgA pol, en los que existe en el sue-- ro una elevada tasa de polímeros; sin embargo creemos que este problema no ha sido investiga-- do, y que por otra parte puede estar enmascara-- do por la presencia de otras formas de afecta-- ción renal características del mieloma.

-----

Pag. 113

CONCLUSIONES

Los resultados de nuestro trabajo nos -  
permiten establecer las conclusiones siguientes.

(1).- En el SHN existe verdadera IgA pol  
en cantidad suficiente como para ser detectada  
por métodos inmunoquímicos convencionales. Su  
carácter polimérico se define sobre las siguien  
tes bases: elevado peso molecular, afinidad por  
el CS "in vitro", y presencia de cadena J como  
una parte integrante de la molécula.

(2).- La cantidad exacta de IgA pol pre--  
sente en el SHN, no pudo ser determinada, pero  
los experimentos presentados en la primera par--  
te en especial el presentado en la figura 5 ---  
(pag. 39) sugieren firmemente que la mayor par--  
te de la IgA "pesada" (alrededor del 10% de la  
IgA total del suero) es verdadera IgA poliméri--  
ca.

(3).- La cantidad de cadena J presente en  
esta IgA fué comparativamente análoga a la pre--  
sente en una preparación de IgM monoclonal ex--  
presadas en términos de molaridad. Este resulta  
do está de acuerdo con los presentados por dife  
rentes grupos que sugieren la existencia de una  
cadena J por polímero de Ig independientemente  
de su clase. Por otra parte del análisis de nues  
tro resultados se deduce una cierta heteroeoge--  
neidad de contenido en cadena J en las diferen  
tes moléculas de IgA pol.

(4).- El análisis de la cinética de la --  
formación de complejos entre el CS y la IgA pol

"in vitro" puso de manifiesto que ambas moléculas se combinan rápidamente entre sí a temperatura ambiente, alcanzándose casi el 80% de la capacidad de combinación en la primera hora; - después la unión va siendo más lenta alcanzándose la saturación a las veinticuatro horas de incubación figura 10 (pag. 51).

(5).- En cuanto a la cinética de la formación de enlaces covalentes entre ambas moléculas, nuestros experimentos demuestran que su formación se inicia muy rápidamente a los pocos minutos de incubación "in vitro"; estando aproximadamente el 15% de los complejos unidos covalentemente a los cinco minutos de incubación.

(6).- La formación de complejos no inmunes de IgA-álbumina, ó IgA-alfa A-T, ha sido reiteradamente descrita en estudios con para-proteínas IgA y se ha demostrado también en la IgA del SHN. En nuestro estudio hemos encontrado este tipo de complejos en todas las preparaciones de IgA pol.

(7).- El estudio de muestras del suero de un enfermo con ictericia Obstructiva, demostró una considerable elevación de la concentración de IgA principalmente de la fracción IgA pol. Tras la remisión espontánea de la obstrucción biliar, observamos un rápido descenso del nivel de IgA en el suero, aparentemente selectivo para la fracción polimérica (siete veces mayor que el descenso de la fracción monomérica). Aunque se trata de una sola observación,-

creemos que puede ser suficiente para proponer como se ha demostrado en la rata, que la obstrucción biliar se bloquea un mecanismo fisiológico de eliminación de IgA pol del suero a través del hígado.

(8).- El análisis por I.E.F., y doble difusión en gel, demostró la presencia de CS unido a la IgA en la primera muestra del enfermo; lo que prueba que la IgA pol retenida como consecuencia de la obstrucción, estaba en el suero en forma de IgA S probablemente debido a la incorporación "in vivo" del CS a la IgA a nivel del hígado o de las vías biliares.

(9).- De acuerdo con estas observaciones (7 y 8) y los resultados publicados en la literatura, proponemos un modelo hipotético de circulación de la IgA pol en el organismo, y de la intervención del sistema hepatobiliar en la inmunofisiología de la IgA (pag. 103 y figura 18).

(10).- El carácter polimérico de la IgA depositada en los riñones de algunos enfermos cirróticos, fué demostrada con una técnica de I.F. indirecta al probar su afinidad por el CS "in vitro". Este hallazgo sugiere que la IgA pol puede tener alguna significación patológica en estos pacientes.

(11).- Los niveles séricos de IgA pol (determinada en un amplio "pool" de sueros normales) constituyen aproximadamente el 10% de la IgA total, con variaciones mínimas arriba -

o abajo.

(12).- Por el contrario los niveles de IgA "pesada" en el suero en un grupo de diez enfermos cirróticos, estaban significativamente elevados en el 80% de los casos, lo que -- nos permite sugerir que una elevación de ésta fracción de la IgA constituye un acontecimiento frecuente en la cirrosis probablemente, de bido al fracaso funcional del hígado en el -- aclaramiento de la IgA pol.

(13).- La posible relación entre los - depósitos de IgA pol en el riñón y la presencia de niveles elevados de IgA pol en el suero, aunque no definitivamente demostrada, se refuerza por la observación de que en los dos casos en que hemos encontrado depósitos de -- IgA en riñón, sin afinidad por el CS (IgA no pol), los niveles séricos de IgA pol estaban dentro de los límites normales.

-----

Pag. 118

- RESUMEN Y PERSPECTIVAS -

La existencia de IgA pol en el S H N - la hemos demostrado por filtración en gel, seguida de identificación de la cadena J y demostración de la afinidad "in vitro" por el CS en las fracciones de IgA de peso molecular elevado. La cantidad de verdadera IgA pol presente en el suero normal la hemos estimado en aproximadamente el 10% de la IgA total.

El estudio de las propiedades inmunológicas de esta fracción de la IgA, reveló un contenido en cadena J aproximadamente similar al de una paraproteína IgM 19 S, cuando ambas muestras fueron reducidas a igual concentración molar. Una rápida cinética en la combinación con el CS, que se inicia por fuerzas no covalentes y que rápidamente se estabiliza -- por enlaces disulfuro; y finalmente la presencia constante de cantidades indeterminadas de complejos de IgA con otras proteínas del suero (álbumina y alfa A-T).

Las variaciones observadas en los niveles séricos de IgA pol en relación con la obstrucción biliar, demuestran la retención selectiva de la IgA pol al momento de la obstrucción y su rápida eliminación al liberarse el proceso obstructivo. Este resultado apoya el concepto de que en el hombre como ocurre - en los roedores, existe un mecanismo de secreción activa a cargo del sistema hepato-biliar



que bombea polímeros de IgA del suero a las secreciones externas. La presencia de CS asociado a la IgA pol retenida en el suero, sugiere que la IgA pol se secreta normalmente al intestino en forma de IgA S.

La presencia de IgA pol en secciones renales de enfermos cirróticos con glomerulonefritis fué demostrada en varios pacientes. Este hallazgo sugiere un posible papel patógeno de la IgA pol que probablemente está relacionado con la elevación de los niveles séricos de esta fracción de la IgA en la mayor parte de los cirróticos. A favor de este posible mecanismo patogénico está el hecho indirecto de que en dos casos que tenían niveles normales de IgA pol en el suero, los test de afinidad por el CS en las biopsias renales fueron negativos.

Nuestro trabajo creemos que aporta algunas conclusiones válidas a cerca de las propiedades de la IgA pol y su significación fisiopatológica. Sin embargo no ha tratado de ser exhaustivo y deja abiertas varias interrogantes entre las que citaremos:

(a) ¿Cual es el origen celular de la IgA polimérica?.

(b) Si los niveles séricos de esta fracción de la IgA están controlados por una función hepática, ¿podrán ser utilizados como un índice de actividad funcional en enfermos hepáticos?.

(c) ¿Cual es la contribución exacta de la IgA pol al sistema inmunosecretor humano?.

(d) ¿Cual es la transcendencia fisiopatológica de la acumulación de IgA pol en el suero?.

-----

B I B L I O G R A F I A

- B I B L I O G R A F I A -

- 1 ANDRE F. André C.- Biol Gastroenterol 9 - 147-1976.
- 2 AZELSON H. Johanson EG Rymo L.- Acta Chem. Scand 20  
2339-1966.
- 3 BAXTER JH. Ashworth C.T.- Arch Pathol 41-476-1946
- 4 BERGER J. YATSEVA H. HABARRA B.- Actualités Néphrolo-  
giques de l'hôpital Necker: Flammarion p 165-1977.
- 5 BESHEDKA.- Ann. Inst. Pasteur 33 - 682 - 1949.
- 6 BLOODWORTH J.M.B. Jr. SOMERS S.C.- Lab. Invest.  
6 -962 -1959.
- 7 BRANDTZAEG P.- Immunology 29-323-1971
- 8 BRANDTZAEG P.- Nature 241 - 142 - 1973
- 9 BRANDTZAEG P.- The Immunoglobulin A System: Editt. -  
Hestvedt J. Lawton A.R. Plenum Press p. 37-1974 (a)
- 10 BRANDTZAEG P.- Scand J. Immunol 3 - 707 - 1974 (b)

- 11 BRANDTZAEG P.- Scand J. Immunol 4 -439 - 1975 (a).
- 12 BRANDTZAEG P.- Scand J. Immunol 4 -837 - 1975 (b).
- 13 BRANDTZAEG P.- Scand J. Immunol 5 -411 - 1976 (a).
- 14 BRANDTZAEG P.- La Ricerca Clin Lab. 6 Supl 3 p  
15 1976 (b).
- 15 BRANDTZAEG P.- Immunochimistry 14 - 179 - 1977.
- 16 BROWN W.R.- Newcomb R.W. Ishizaka K J. Clin Invest  
49 - 1374 - 1970.
- 17 BUCKLEY RH.- DESS S.C.- New Engl J Med. 281 - 465-1969
- 18 BULL C.G.- MC KEE C.M.- Amer J. Hyg 9-490-1929.
- 19 CALLARD P.- FELDMAN G.- PRANDI D.- BELAIR H.F. ---  
MANDEL C.- WEISS Y.- DRUET P.- BENHAMON J.P.- BANIE  
LY J.- Amer J. Path. 80 -329-1975.
- 20 CAMBIASO C. GOFFINET A. VIERMAN J.P. HEREMANS J.F.-  
Immunochimistry 12 - 273 - 1975.
- 21 CEBRA J.J. SMALL P.A.- Biochem 6 - 503 - 1967.
- 22 CRABBE P.A. CARSONARA A.D. HEREMANS J.F.- Lab. Invest.  
14-235-1965.

- 23 CRABBE P.A. HEREMANS J.F.- Rev. Franc Etud Clin Biol 2 -484 -1966.
- 24 CRABBE P.A.- Tesis Doctoral. Arscia Bruselas 1967.
- 25 CRABBE P.A. BAZIN H. HEYSEN H. HEREMANS J.F.- Int. Arch Allergy 34-362-1966.
- 26 CRABBE P.A. NASH D.R. BAZIN H. EYSEN H. HEREMANS J.F.- Lab. Invest. 22-448-1970.
- 27 CRAIG S.W. CEBRA J.J.- J. Exp. Med. 134 - 188-1971.
- 28 CUADRADO E. VAERMAN J.P.- Prot. Biol Fluids XXV- 915 - 1973.
- 29 CUNNINGHAM R. RANGLES M. LARUE M.E. Amer J Biol - Chem. 250 - 1987 - 1975.
- 30 CHORDIKER W.B. TOMASI T.B.- Science 142 -1020-1963.
- 31 DE LA CORTE E. PARKHOUSE M.R.E.- Biochem J 136-569-1973.
- 32 DE LA CORTE E. PARKHOUSE M.R.E.- Biochem J 136-597-1973.
- 33 DE LA CORTE E. PARKHOUSE M.R.E.- Biochem J 136-607-1973.

- 34 DORRINGTON K. TANFORD C.- Advanc. Immunol 13-  
333-1970.
- 35 DOURMASKIN R.B. VIRELLA G. PARKHOUSE R.N.E.- J.  
Mol Biol 56 - 207 -1971.
- 36 DRUET P. LETONTUTIER P. COUTET A. MANDET C. -  
Clin Exp. Immunol 15 - 483 - 1973.
- 37 ESKELAND J. SCAND J.-Immunol 3 -757- 1974 (a)
- 38 ESKELAND J. BRANDTZAEG P. Immunochemistry 11 -  
161 - 1974 (b).
- 39 FERGUSON A. PARROTT DMW.- Clin. Exp. Immunol -  
12 - 477 - 1972.
- 40 FERGUSON A.- Immunological aspects of the liver  
and gastro intestinal tract (NEP) 1976.
- 41 FUBARA E.S. FRETERER J.- Immunology 111-395-1973.
- 42 GHETIE V. NOTA G.- Immunochemistry 10 - 839 - 1973.
- 43 GLUCK H.I. HONG R.- J Clin Invest. 44 - 1866-1965.
- 44 GOLDBERG L.S. BARNETT. E.V. FUDENBERG H.H.- Jolab.  
Clin Med. 12 - 204 - 1968.
- 45 GOUPIL A.- Tesis Doctoral Paris Saint Antoine 1975.

- 46 GOWANS J.L. KNIGHT E.T.- Proc. Roy Soc B. 159-  
257-1964.
- 47 GUGLER V.E. BOKELMAN G. DATWYLER A. MURALT G.V.-  
SCHWIZ.- Med. Woenschr 50 - 1264 - 1958.
- 48 GUY-GRAND D. GRISCELLI C. VASALLI P.- Europ J. -  
Immunol 4 - 435 -1974.
- 49 HALL J.G. SMITH M.E.- Nature 226 - 162 - 1970.
- 50 HALL J.G.- Progress Immunol II vol 3 North Holland  
pag. 15. 1974.
- 51 HALPERN M.S. KOSHLAND M.E.- Fed Proc. 31 -755-1972.
- 52 HAUPTMAN S.P. TOMASI T.B.- J.Biol Chem 250-3891-1975.
- 53 HEREMANS J.F.- Les globulines seriques du systeme  
gamma Arsacia Bruselas 1960.
- 54 HEREMANS J.F. HEREMANS M.TH.- Acta Med. Scand Supl.  
367 - 27 - 1951.
- 55 HEREMANS J.F. VAERMAN J.P.- Progress Immunology I -  
Academia Press pag. 875 - 1971.
- 56 HOBBS J.R.- Prot. Biol Fluids XXV - 1973.
- 57 HOFF U. BRANDTZAEG P. MUTTEROTH. MEYER KH.- Scand  
J.Immunol 2 - 543 - 1973.



- 58 HORN R.C. Jr. SMETANA H.- Amer. J.Pathol 18 -93 -1942.
- 59 HURLIMAN J. WALDESEBUHL M. ZUBER C.- Biochem Biophys -  
Acta 181 -393-1968.
- 60 HYMAN L.R. WAGNILD J.P. BAIRE G.J. BURKHOLDER P.M. --  
Kidney Internat 3 -397-1973.
- 61 IMMAN F.P. MESTEDKY J.- Contemporary Topics in Molecu  
lar Immunology vol 3 - 111- 1974.
- 62 JACKSON G.D.F. TENAIRE-COELHO I. VAERMAN J.P. BAZIN  
H. BECKERS A.- Europ J.Immunol 7 -12-1978.
- 63 JERRY L.M. KUNKEL H.G. ADANS L.- J.Immunol 111-162-1974.
- 64 JONES W.A. RAO D.R.G. BRAUNSTEIN H.- Amer J. Pathol -  
39-393-1961.
- 65 KOBAYASHI K.- Immunochemistry 8 -785 - 1971.
- 66 KOBAYASHI K. VAERMAN J.P. HEREMANS J.F.- Europ J. ---  
Immunol 3 - 273 -1973 (b).
- 67 KOBAYASHI k. VAERMAN J.P. HEREMANS J.F.- Immunochemis  
try 10 - 73 - 1973 (a).
- 68 KOMAR P:-CANAN J.- Biochem 53 - 943 - 1975.
- 69 KOSHLAND M.E.- Advanc Immunol 20 - 41 - 1975.

- 70 KOWNATZI E.- Immunol Comunic. 2 - 105 - 1973 (a)
- 71 KOWNATZI E. DRESCHER R.M.- Clin Exp. Immunol --  
15 - 557 - 1973 (b).
- 72 LALLI M.E.- Advanc Immunol 22.
- 73 LALLI M.E. GREENBERG J.- Biochem 11 - 2744-1972.
- 74 LAURELL C.B. THULIN E.- Immunochemistry 11 703-1974
- 75 LAURELL C.B. THULIN E.- Scand J. Immunol 4 sup.  
3 - 57 - 1975.
- 76 LAURELL C.B. THULIN E. CRUBB A.- La Ricerca --  
Clin Lab 6 Supl 3 - 57 - 1976.
- 77 LEMAITRE-COELHO I. JACKSON G.D.F. VAERMAN J.P.- -  
Europ J. Immunol 7 - 588- 1977.
- 78 LEMAITRE-COELHO I. JACKSON G.D.F. VAERMAN J.P.- -  
J. Exp. Med. 147 - 934 - 1978.
- 79 LEMAITRE-COELHO I. JACKSON G.D.F. VAERMAN J.P.- -  
Scand J. Immunol 8 - 459 - 1978.
- 80 Lindh E.- Immunol 114 - 284 - 1975.

- 81 LINDH E. BJORK I.- Europ J. Biochem 45 - 261 - 1974.
- 82 LINDH E. BJORK I.- Europ J. Biochem 62 - 263 - 1976(a).
- 83 LINDH E. BJORK I.- Europ J. Biochem 62 - 271 - 1976(b).
- 84 LINDH E. BJORK I.- Acta Pathol Microbiol Scand serie C 85 - 449 - 1977.
- 85 MACH J.P. - Nature 228 - 1278 - 1970.
- 86 MANCINI G. VAERMAN J.P. CARBONARA A.O. HEREMANS J.F.  
Prot Biol Fluids XI - 370 - 1963.
- 87 MANIGAND G. MOREL-MAROGER L. SIMON J. DEPARIS M.- ~~9~~-  
Rev. Europ Et. Clin Biol 15 - 939 - 1970.
- 88 MANNIK M.- J. Immunol 99 - 899 - 1967.
- 89 MC-COMMAGEY P.J. DILON F.J.- Int. Arch. Allergy 22  
35 - 1966.
- 90 MESTEDKY J. KULHAVY R. KLAUS F.W.- J. Immunol 103  
738 - 1972.
- 91 MESTEDKY J. SCHROEDLOHER R.E. KULHAVY R. WRIGHT G.P.  
TOLNIA N.- Proc. Nat. Acad Sci U.S. 131 - 393 - 1974.

- 92 MOORE A.R. HALL J.G.- Nature 239 - 161 - 1972.
- 93 NEWCOMB R.W. NORMANSELL D. STAMWORTH H.D.R.- J. Immunol 101 - 1401 - 1968.
- 94 NOCHY D. DRUET P.- Min Med 69 - 3243-1973.
- 95 OGRA P.L. KARZON D.T.- J. Immunol 102 - 15 - 1969
- 96 PARROT.- En Immunological Aspects of the liver - and gastro intestinal tract M.T.P. 1976.
- 97 PATEK A. J. SEEGAL D BEVANS M.- Amer. J. Med Sci. 221 - 77 - 1951.
- 98 RADL J.L. KLEIN F. VAN DEN BERG P DE BRUYN A M. - HYMANS W 20 - 343 - 1971. *Immunology*
- 99 RADL J.L. SCHUIK B. HIJMANIS W.- En Iga Symposium Edit. Mestedky J. Plenum Press 1975.
- 100 RADL J.L. STUART.- AND MESTEDKY J.- Proc. Soc. -- Exp. Biol Med. 150 - 432 - 1975.
- 101 ROSENSTEIN RW. MUSSON R.A. ARMSTRONG M. KONIGSBERG W H. RICHARDS.- Proce. Nat. Acad. Sci. U.S. 69-577-1972.
- 102 SAKAGUCHI H. DACHS B. GRIMMETT E. PARONETTO E. SA LOMON M. CHURE J.- Lab. Investig. 14 - 532 - 1965.
- 103 SALOMON M.L. SAKAGUCHI H. CHURE J. DACHS B. col. Arch. Int. Med. 115 - 704 - 1965.

- 104 SOUTH M.A. COOPER M.D. HONG R. WOLHEIM F.A. GOOD R,  
A.- J. Exp. Med. 123-615-1966.
- 105 STEWARD M.W.- Biochem Biophys Acta 236 - 440- 1970.
- 106 SVEHAG J.E. BLOTH R.- Science 163 -847 - 1970.
- 107 TOMASI T B Jr. BIENESTOX J.- Advanc Immunol 9-1-1968
- 108 TOMASI T B Jr GREY.- Progress Allergy.
- 109 TOMASI T B Jr. HAUPTMAN S.- I. Immunol 112-2274-1974 (a)
- 110 TOMASI TB Jr. HAUPTMAN S.- En IgA Sympopsium Edit.  
Nestedy. Plenum Press pg. 111-1974 (b).
- 111 TOMASI T B Jr. CZERWINSKI.- Scand J Immunol 5-647-1976.
- 112 TRIGER D.R. ALP M H. WRIGHT R.- Lancet 1-60 - 1972.
- 113 UNDERDOWN B.J. de ROSE J. KOZEKAI HK. SOCKEN D. --  
WEICKER J. Immunochemistry 2 - 411 - 1976.
- 114 UNDERDOWN B.J. de ROSE J. PLANT A.- J.Immunol 112  
1316- 1977.
- 115 VAERELAN J.P. Tesis Doctoral Arscia Bruselas 1970.

- 116 VAERMAN J.P.- Res Immunochem Immunobiol 3-91-1973.
- 117 VAERMAN J.P. KOBAYASHI K. BAZIN H. LEBACQ-VERHEYDEN  
A.M. HEREMANS J.F.- J Immunol 111-1590-1973 (a).
- 118 VAERMAN J.P. ANDRE C. BAZIN H. HEREMANS J.F.- Europ  
J Immuno 3 - 580 - 1973.
- 119 VAERMAN J.P. LEMAITRE-COELHO I.- Simposium sobre -  
Transmission of Protein across living membranes --  
M.T.P (1979).
- 120 VAERMAN J.P. LEMAITRE-COELHO I. JACKSON G.D.F.-S IgA -  
Symposium Edit Mc Ghee Mestedky Plenum Press 1973.
- 121 WALDMAN RH. KASEL J.A. FULK R V. MANN JJ TOGO Y.-  
Nature 213 - 594 - 1968.
- 122 WALDMAN RH. MANN JJ. SMALL PA.- J. Amer Med Ass 207-  
520- 1969.
- 123 ZEIGER J. UNDERDOWN BJ - J. Immunol 114 - 1337-1975.
- 124 WILDE C.E. KOSHLAND M.E.- Fed. Procs 31-755-1972.
- 125 WILDE CE. KOSHLAND M.E.- Biochem 12-2212 - 1973.
- 126 WILLIAMS A.F. GOWANS J.L.- J. Exp. Med 141- 133- 1975.

